王荫长　主编

# 昆虫生物化学

KUNCHONG SHENGWU HUAXUE

中国农业出版社

# 昆虫生物化学

王荫长 主编

中国农业出版社

**图书在版编目（CIP）数据**

昆虫生物化学/王荫长主编．－北京：中国农业出版社，2001.1

ISBN 7－109－06562－6

Ⅰ．昆…　Ⅱ．王…　Ⅲ．昆虫学：生物化学　Ⅳ．Q966

中国版本图书馆CIP数据核字（2000）第42550号

中国农业出版社出版
（北京市朝阳区农展馆北路2号）
（邮政编码100026）
出版人：沈镇昭
责任编辑　杨国栋

中国农业出版社印刷厂印刷　新华书店北京发行所发行
2001年2月第1版　2001年2月北京第1次印刷

开本：787mm×1092mm 1/16　印张：31.75
字数：723千字　印数：1～1 000册
定价：115.00元

# 内容简介

本书内容包括昆虫生物化学的基础——昆虫细胞学和昆虫中间代谢，昆虫体内的多种肽类和蛋白质、几种重要激素及其化学、昆虫的免疫化学和生殖有关的生化知识，着重阐述了多种重要肽类、蛋白质和激素，以及它们的生物合成、代谢过程和受体的结构，并扼要叙述了有关的分子生物学、作用模式和调控机制。

供高等学校研究生选读昆虫生理学、昆虫生物化学和昆虫分子生物学作参考教材，也可供昆虫生理生化与毒理以及从事昆虫分子生物学人员作参考书。

**主　编**　王荫长
**参　编**　李国清
　　　　　陈长琨
　　　　　韩召军

# 前言

现代昆虫科学愈来愈离不开生物化学，它不但是昆虫生理学和分子生物学的前导，也是众多应用学科的基础。许多昆虫工作者都希望在研究对象和现象时，搞清其中存在的机理。机理在哪里？我觉得极大部分都在生物化学之中。如果没有生物化学作为基础和支撑，我们在昆虫的微观世界中行进，必然会遇到很多“暗箱”，虽然可以看到一些事物的因果，但最终却无法了解昆虫是怎样完成种种奥秘的全过程。

20世纪中期，昆虫生物化学刚刚起步，有关知识，大多限于物质代谢及其生理作用方面，进入60年代，随着电子显微镜的应用和昆虫细胞生物学的发展，在昆虫界开启了一扇通向微观世界的大门；同时现代化超微量分析技术的应用，昆虫体内一系列生物活性物质得到了分离和提纯，对昆虫生长发育和变态及其调控机制的认识有了重大的突破；进入80年代，分子生物学的崛起和普及，至90年代昆虫体内很多重要的基因得到了分离、提纯、克隆和测序。现在从网上就可以快速查到许多决定昆虫生命特征的基因及其核酸序列了。同时，蛋白质研究和测序工作也被推进到了一个新境界，许多模式昆虫也因此成为人们探索生命本质的重要研究对象。

面对昆虫分子生物学的发展，我们的知识显然相当欠缺，首先在生物化学方面，很有从头学起的必要。20世纪70年代，当时昆虫细胞生物学刚刚兴起，就使昆虫学面貌为之一新，我们的业师尤子平教授，花了几个月时间钻研细胞生物学，并亲自为我们授课，他在晚年倾其全力，一边编写“昆虫生理和生物化学”，一边为年轻教师和研究生讲课，使众多学子受益匪浅，可惜由于种种原因这本著作未能付梓。转眼20年过去了，当年很多学生已经步入老年，昆虫生物化学在分子生物学的推动下，又有了新的发展，我们作为尤子平教授的学生，形成了一个共识：编写一本《昆虫生物化学》，既作为研究生学习的参考书籍，也作为对

尤子平教授诞生80周年的纪念，来缅怀这位南京农业大学创建昆虫生理生化学科作出贡献，推动了全国农业院校昆虫学科的发展。

经过三年的写作，这本书终于脱稿了，在此衷心感谢曹梅讯和徐卫华教授以及日本朋友永田彻教授为我们提供重要参考文献，还要向帮助我们完成这项任务的彭宇博士和历届研究生表示感谢，十分抱歉，由于人员众多，无法一一表示我们的谢意。在全书15章中，第1章由陈长琨教授执笔，第8章由韩召军教授执笔，李国清副教授承担6、9、11、12和15章的编写工作，其余各章均由本人编写。在脱稿之际，深感书中不仅系统性和理论性方面存在不少缺憾，从昆虫生化各领域的发展来看，难免存在挂一漏万的问题，尤其是很多新的进展，很难搜集完全，为此，衷心希望同行和读者给予批评指正，以便及时补充和改正。

另外，本书写作时全国统一的“昆虫学名词”正在讨论之中，我们注意到许多名词尽量符合统一命名的要求，但有些名词难免与统一的名词不一致，因此在中文名称之后，都注有英文原名，以免发生误解。

在生物化学中遇到分子量的表述问题，国际上通用道尔顿（用kDa或Da），但我国出版界新规定一律用“u”表示，因此在翻译时出现了一些无法克服的困难。例如30kDa，在书中已改用$30\times10^3$u，但像30kDa蛋白一类专门名词，为便于沟通，只好仍然保留“30kDa”，没有采用“$30\times10^3$u蛋白”这样的表达方式，请读者予以谅解。

王荫长

2000.3.8　南京农业大学

# 目 录

# 第一章 昆虫生物化学的基础
## ——细胞结构与功能

细胞是昆虫形态结构和生命活动的基本单位，要研究昆虫各器官系统的组分及其生理功能的化学变化规律，必须从细胞入手。首先需了解昆虫在生长、发育、变态和繁殖的过程中各器官的细胞和亚细胞结构及其动态变化，再进一步探索它们对营养物质的消化和吸收、水分和盐分的平衡调节、对有害生物的抵御和防卫、刺激的接受和传递、信息的综合与处理、物质的代谢和转化、生长发育的激素调控、子代的繁衍和扩增等有关的生化代谢规律。

在动物界中昆虫种类最多、分布甚广、生境复杂、繁殖力强。这是由于昆虫和其他动物细胞除了具有结构和功能的相似性外，还存在许多特异性，赋予昆虫强大的生命力。就保持水分而言，昆虫虽身体小而表面积大，但各器官细胞有一系列特化结构来防止体内水分散失和稳定体液渗透压。例如皮细胞质膜外伸形成蜡道，往体表分泌蜡质保护层；顶膜、侧膜和基膜特化的马氏管和直肠细胞构成隐肾结构，加速对离子和水分的吸收；内质网和高尔基器特别丰富的雄蛾附腺细胞和雌蛾滤胞细胞的分泌物构成的精包和复杂的卵壳结构，保证昆虫在缺水条件下受精和胚胎发育；气管细胞分泌的胞外基质构成的气门开闭机构，有节律的定期开放，暴发式排除二氧化碳，使呼吸失水量减少至最低程度。

“细胞变态”是昆虫细胞另一个特点，在虫体变态时，幼虫细胞结构和功能发生改变，重新组建成虫器官细胞，这在全变态昆虫中尤为突出。因此，研究昆虫细胞和亚细胞在变态过程中结构和功能的动态变化，是深入了解昆虫生物化学的基础。

## 第一节 细胞表面结构

细胞表面是由细胞质外层特化构成的，包括细胞质膜、质膜

外的细胞外被（cell coat）或糖萼（glycocalyx）、质膜内的胞质溶胶（cytosol）。细胞外被是一层细丝状结构，主要成分为糖蛋白和糖脂。糖蛋白的低聚糖链是细胞表面的各种受体，有些高度特异性的糖蛋白是抗原，对细胞有保护、连接、支持、识别和免疫等功能；胞质溶胶含有高浓度蛋白质，具有较多的微管和微丝与质膜相连，使这部分细胞质具有抗张强度，能维持细胞的极性和形态。

细胞表面在细胞生命活动中起着重要作用，与物质运输、激素作用、细胞免疫、神经传导和细胞发育等方面密切相关。如物质跨越消化道和马氏管细胞表面的被动扩散和主动运输，能加速对营养物质的消化吸收和离子、水分的调节；激素与靶细胞表面受体的结合后，引起一系列生理效应，促进细胞生长、发育和变态；环境因素刺激神经细胞表面膜电位改变，能产生神经轴突部位的动作电位传导、以及突触部位神经递质的化学传导；血细胞表面对外源物的识别，能产生防卫和免疫作用等等。

在由外胚层发育的细胞顶膜表面，细胞分泌的胞外基质，按特定的方式沉积表皮层。表皮是一种含有蛋白质、几丁质和脂类等大分子物质的细胞顶膜外复合结构。它形成体壁的表皮、肌肉着生的骨骼、消化道的内膜、气管的螺旋丝等。表皮不仅是保护和支持的屏障，而且对细胞运动和呼吸也起到积极作用。

## 1　质膜的结构和化学组成

质膜又称细胞膜。它使细胞内部和外界环境分隔，保持和调节细胞内微环境的相对稳定。昆虫细胞膜的顶膜、侧膜和基膜有明显特化。除质膜外还存一类膜称为细胞内膜，包括线粒体膜、高尔基复合体膜、内质网膜、溶酶体膜和核膜等，在各自生理活动中具有特殊作用。上述两类膜统称生物膜。

质膜是脂质双分子层和蛋白质交互排列形成的膜状结构，具有可塑性，流动性和不对称性。质膜主要含有蛋白质、脂质和糖类。脂是膜的基本骨架，蛋白质是膜执行功能的主要成分。多数细胞膜脂类约占总量的 50%，蛋白质占 40%，糖占 2%～10%，但各种不同细胞的质膜，其比例存在差异（图 1-1）。

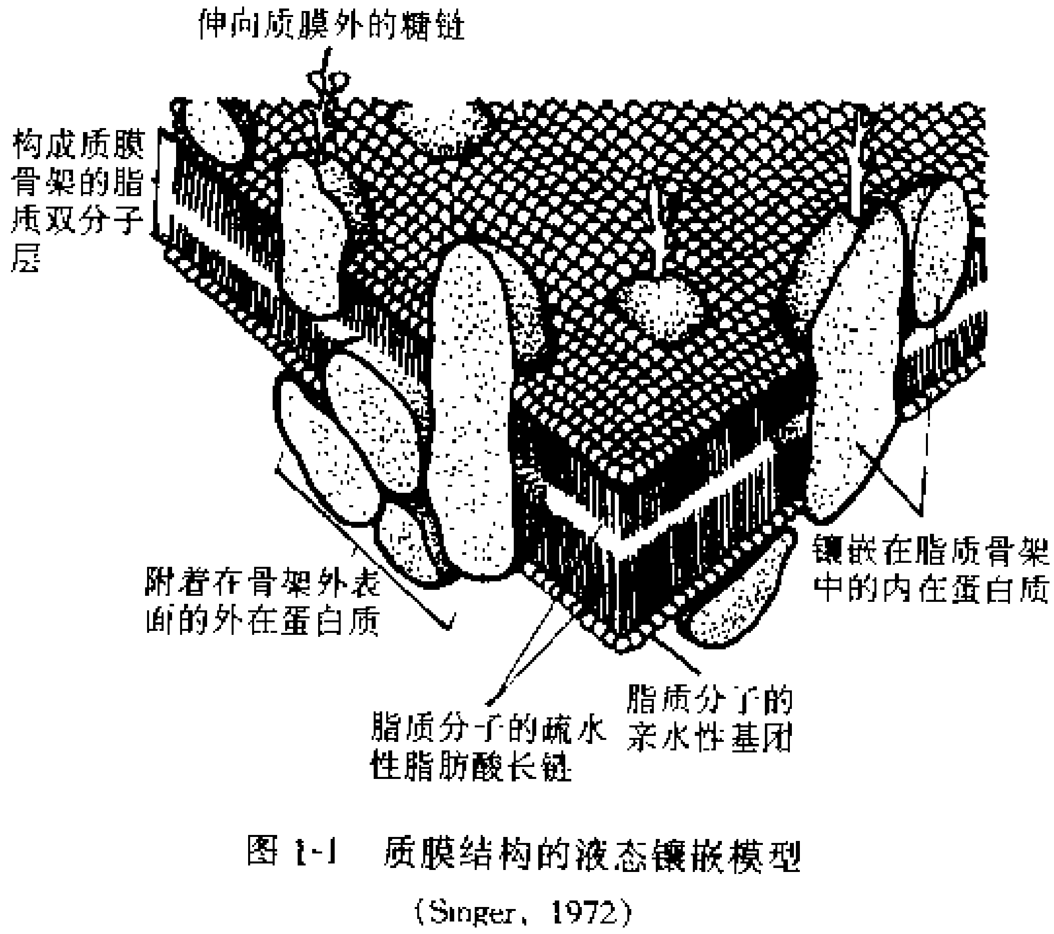



图 1-1　质膜结构的液态镶嵌模型
（Singer，1972）

膜脂有 100 多种，主要有磷脂、胆甾醇和糖脂。脂质分子一端为亲水性甘油端的头部，能结合磷酸盐等离子基团，分子的另一端为脂肪酸的尾部，为脂溶性，具有疏水特点。这种一端亲水和另一端疏水的分子称为双亲媒性分子，构成了质膜的基本骨

架。

分子的疏水基团向内连接成两层磷脂分子间的界线，而亲水基团伸向外端与蛋白质分子相连。双层磷脂分子可能处于恒定的运动状态，它们的结构和性质对膜的特性起着重要作用，并形成通透性屏障。细胞种类不同，膜内脂的化学组成也不同。其中的脂肪酸在生理温度下，不形成严密的晶格，而表现液晶的特性。不饱和脂肪酸的含量，对物质通过膜的运载过程有重要影响。膜内存在大量不饱和脂肪酸时，如在寒冷气候条件下生活的有机体，膜内的不饱和脂肪酸的含量往往较高，移运物质的过程特别快。

膜蛋白有 50 多种，它们并不形成均匀的层次，而呈现非常不规则的分布状态。按脂质在双分子层骨架上所在的位置分为两类：内在蛋白（内嵌蛋白），占膜蛋白的 70%～80%，不溶于水，与脂质骨架结合牢固，具有双亲媒性，镶嵌在脂类层内，或从膜的一侧横贯至另一侧，构成蛋白质的氨基酸有些是亲水性的如赖氨酸、组氨酸、精氨酸、天门冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸，亲水端伸出膜表面，可与糖类活性部位连接形成糖蛋白；另一些疏水性氨基酸则嵌入脂质双分子层内。外在蛋白（边周蛋白），占膜蛋白的 20%～30%。单独或成团与脂类分子的亲水端连接在膜的内侧和外表面上，这些蛋白质不具双亲媒性，而为水溶性，易从膜上分离。

在膜蛋白中，有些蛋白质分子是磷脂分子的合成酶；另一些则是移运化合物通过膜的载体，细胞的特殊活动往往与其质膜含有的特殊分子有关。例如，神经细胞和肌肉细胞质膜内的受体分子能与神经末梢释放的神经传递质分子相结合；前胸腺细胞膜内的腺苷酸环化酶则能结合某些种类的激素产生效应等。

膜糖主要以糖脂和糖蛋白形式存在。结合的糖类主要包括中性糖，如 D-半乳糖、D-甘露糖、L-岩藻糖等；氨基糖如 N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡糖胺，还有 N-乙酰神经氨糖酸（唾液酸）。它们的糖链都伸向质膜外表面，参与构成细胞外衣，具有稳定蛋白质分子使之不发生变形的作用，与细胞的抗原结构和细胞识别有关。

## 2 质膜的运输功能

细胞与外界环境的联系和反应都是通过质膜来完成的。质膜除维持特定的细胞形态，参与细胞内各种代谢活动，具有细胞识别和免疫等功能外，它还能严格控制物质进出细胞，具有选择通透作用。分子量较小的化合物进入细胞的方式，有被动扩散和主动运输两种机制。被动运输的简单扩散和协助扩散是自发的，主动运输需消耗代谢能量。分子量较大的化合物可通过细胞膜的吞噬作用或胞饮作用进入细胞。

### 2.1 被动扩散

脂溶性物质（如甘油、脂类等），由高浓度区域经细胞膜渗入细胞内是一种简单扩散或称自由扩散。而非脂溶性物质跨膜运输则需借助细胞膜上特定的膜运输蛋白，如载体蛋白（carrier protein）或槽蛋白（channel protein）才能促进扩散，称协助扩散或被动间接扩散（图 1-2）。载体蛋白是嵌在细胞膜上的多肽或蛋白质，具有特异性的传递作用，它与特定分子暂时结合改变构像后，将被传递的分子送入膜内，再恢复原有结构；槽蛋白是形

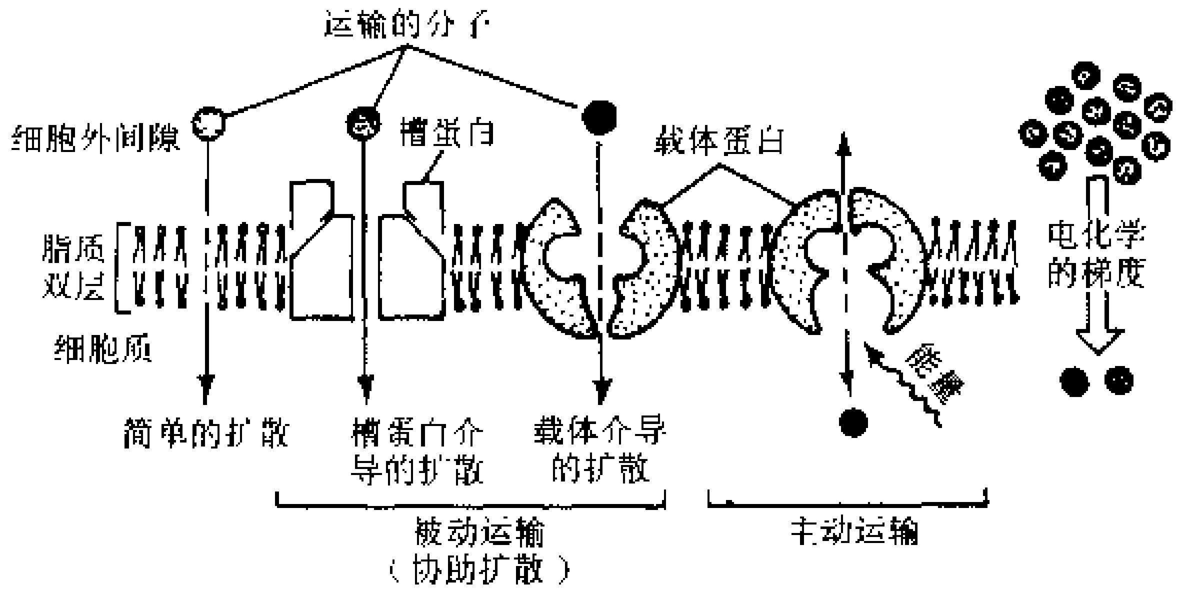



图 1-2　主动运输和被动运输图解
（Alberts 等，1989）

成充满水的孔道结构，穿过脂质双分子层，当这些孔道开放时使离子通过膜进入细胞内。载体蛋白和槽蛋白等膜运输蛋白具有特异性，每种蛋白质只能运载某一类型的化合物，如离子、糖或氨基酸等。

## 2.2　主动运输

物质也可逆浓度梯度运输，即由低浓度向高浓度转移。主动运输不仅有许多酶参与，而且还需消耗能量。最典型的例子是膜结构上存在的钠泵和钾泵，可使很多化合物逆浓度梯度进出细胞。在一般情况下，细胞外面的钠离子浓度要比细胞内大得多，膜上的钠泵能不断地将扩散进细胞内的钠离子吸到细胞外面去，也就是钠泵能逆着浓度差吸出钠离子，保持细胞内部的低浓度，而钠离子的流动又将促使水分子一同移运，并携带着溶解在水中的一些溶质移动。目前认为钠—钾泵是一种镶嵌在质膜上的穿膜蛋白质，为一种分解腺苷三磷酸（ATP）的酶，此酶可进行构像变化，引起离子在膜内外的转位（图 1-3）。

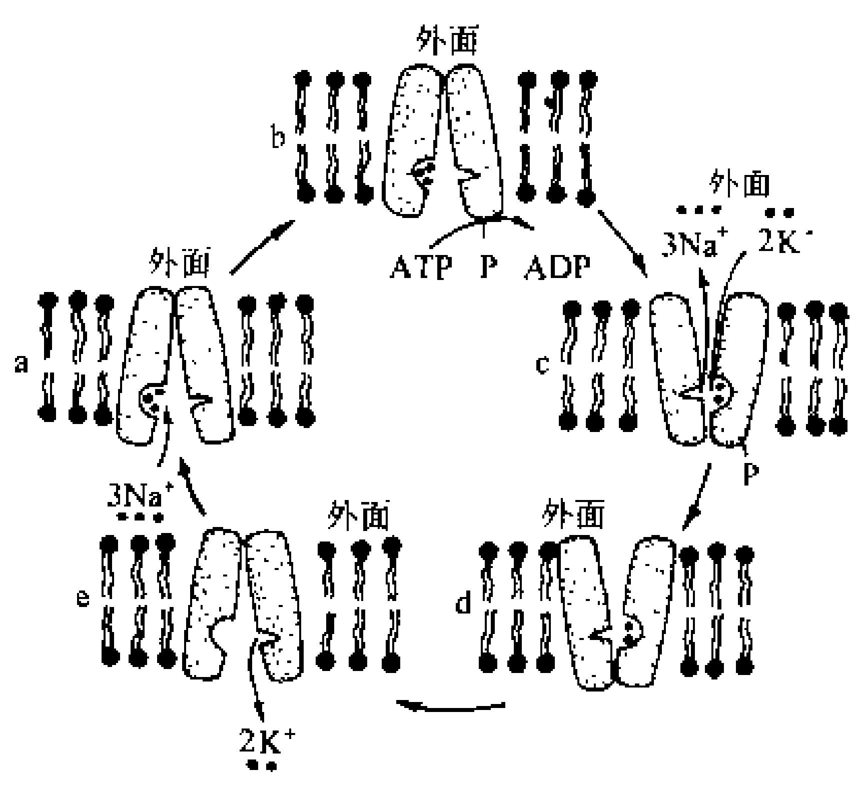



图 1-3　钠—钾泵结构模式图
（Prescott，1988）

在昆虫马氏管细胞的质膜上普遍存在离子泵，已发现推动离子主动运输的离子泵有钾泵、钠泵、钠/钾泵、氯泵、钙泵和镁泵等。在吸血昆虫中（如吸血蝽和舌蝇），钠泵代替钾泵的功能，可能与吸食哺乳动物血液中的钠离子较多有关。在石蛾幼虫、螽斯的马氏管中发现钠离子/钾离子交换泵；在蝗虫马氏管顶膜上存在氯离子泵，能被低浓度的钾离子激活，但不受钠离子、镁离子、钙离子和碳酸氢根离子的影响；在某些昆虫马氏管的基膜和顶膜上，存在钙离子泵，导致钙离

子的跨膜运输；在蚊子幼虫的马氏管中，还发现镁离子泵。

## 2.3 胞吞和胞吐作用

质膜可以通过胞吞（endocytosis）和胞吐（exocytosis）两种质膜运动方式，将大分子化合物在膜内外转移。膜能选择性地结合膜外物质，引起膜变形内陷、融合和脱离，将大分子物质吞入胞内。胞吞的物质为固体称为吞噬作用（phagocytosis），如为液体则称胞饮作用（pinocytosis）。胞吐作用是将细胞内大分子物质，输送至细胞表面而排出胞外。这些物质包括细胞内的代谢产物和蜕变物质。昆虫细胞的胞吞现象中最典型的是卵母细胞摄入卵黄原蛋白，通过细胞膜上的受体引导，使配体与受体结合，形成胞膜小凹，进而成为内吞小胞，最后形成卵黄蛋白球。

昆虫马氏管细胞排除原尿过程中，胞吐方式较为多见。在鳞翅目昆虫小地老虎（幼虫）马氏管细胞中，主要有3种胞吐形式：①微绒毛顶部胞吐。细胞中区含有较多线粒

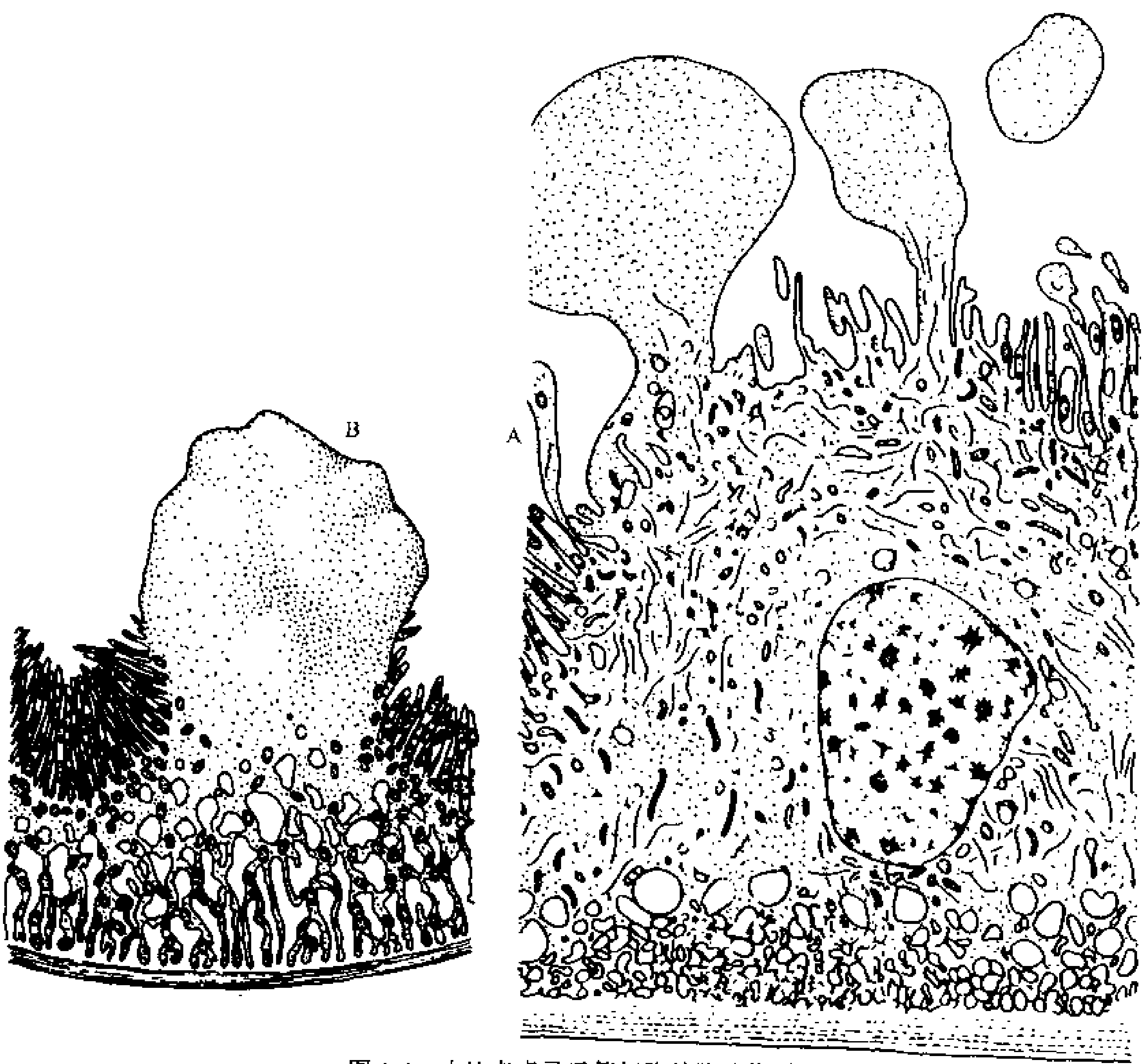



图1-4 小地老虎马氏管细胞的胞吐作用
A. 微绒毛胞吐 B. 顶膜胞吐
（陈长琨、朱荣生，1991）

体，胞吐时先由微绒毛膨大，然后逐渐增大，形成圆形或椭圆形排泄囊，囊体小于细胞体，然后脱离胞体，排入管腔。②微绒毛间胞吐。排泄囊呈圆形或椭圆形，自众多的微绒毛间排出，囊体略小于细胞体。这些细胞基区基膜内褶较深，顶区致密微绒毛内含线粒体，中区亦有较多的线粒体。③顶膜胞吐。排泄囊呈不规则形，囊体超过细胞体若干倍，由顶部排入管腔。排放的物质与细胞质无明显区别。排放囊泡时细胞体积增加极为迅速，排放量远远超过前两类。这类细胞基区基膜内褶较深，广泛的内褶在细胞基部形成大面积的细胞外隙，一直延伸至细胞顶部微绒毛之下，致使马氏管管腔与血腔之间仅以细胞膜和底膜相隔。顶区微绒毛致密，中区有较多的线粒体（图 1-4）。

马氏管细胞的胞吐囊胞和液泡内可能含蛋白质和非活化的蛋白酶，当囊胞通过胞吐作用被排入管腔后，蛋白酶即被活化，使囊胞中蛋白质水解出多种物质，从而提高囊胞的渗透压，管腔中的水为囊胞所吸收，从而使管壁细胞内的水渗入到管腔中，驱动尿液的流动。囊胞的产生和胞吐作用无疑对大分子的运输十分重要，并且能改变管腔的渗透压，从而驱动液流。

## 3 质膜的分化

昆虫质膜分化可存在于顶膜、侧膜和基膜部位。细胞顶膜外延形成精细的指状突起，称为“微绒毛”或细胞微突。它们的主要功能是增加细胞的表面积，有利于对物质的吸收和分泌。微绒毛内部的细胞质可含有平行排列的微丝，一直延伸到顶端，微绒毛外还可覆盖一层黏多糖。细胞基膜内褶和侧膜内陷是细胞质膜的另一种特化构型。由基膜和侧膜的很多深褶形成的细胞内空隙，实际上是细胞外空间或细胞之间的间隙，并可扩展到整个细胞质内甚至达到顶膜附近，还伴有长形的线粒体。质膜特化现象常见于运送离子和液体的上皮细胞中，如马氏管细胞、直肠细胞和中肠细胞。

### 3.1 中肠细胞

中肠柱状细胞质膜的分化主要在顶膜和基膜。细胞具有分泌消化酶和吸收消化产物的功能，是中肠细胞中最基本的一类。它的顶膜特化成微绒毛，附着多种消化食物的水解酶，如二糖酶、肽酶和碱性磷酶等。基膜向内深深的内褶，内含线粒体，构成较大的细胞外隙。质膜的特化增加了细胞对消化酶的分泌和营养物质吸收的表面积。通过 3 种方式将消化酶分泌进入肠腔：一种是顶端分泌（apocrine），酶原粒或液泡直接从顶部微绒毛之间排入肠腔；另一种是局部分泌（merocrine），酶原粒集聚在细胞顶部或侧面，由膜包围成囊泡，进行胞吐外排；第三种是全胞分泌（holocrine），含酶原粒的细胞脱离肠壁进入肠腔，当细胞崩解后即释出消化酶。

中肠杯状细胞的质膜分化在杯腔底部的顶膜部位，与调节血淋巴中钾离子的含量有关。杯状细胞主要存在于鳞翅目和毛翅目幼虫，以及蜉蝣目和捻翅目昆虫中，在肠壁上与柱状细胞相间排列。细胞顶部内陷形成杯腔和杯颈细胞质少，核位于杯腔下方。杯腔基部的微绒毛较长，绒毛内有线粒体；中部微绒毛较短，无线粒体；顶端的微绒毛最短，而且多分叉（图 1-5）。但在各类昆虫中变异很大，如烟草天蛾（*Manduca sexta*）中肠后端的杯状细胞，杯腔较浅，微绒毛中缺少线粒体。

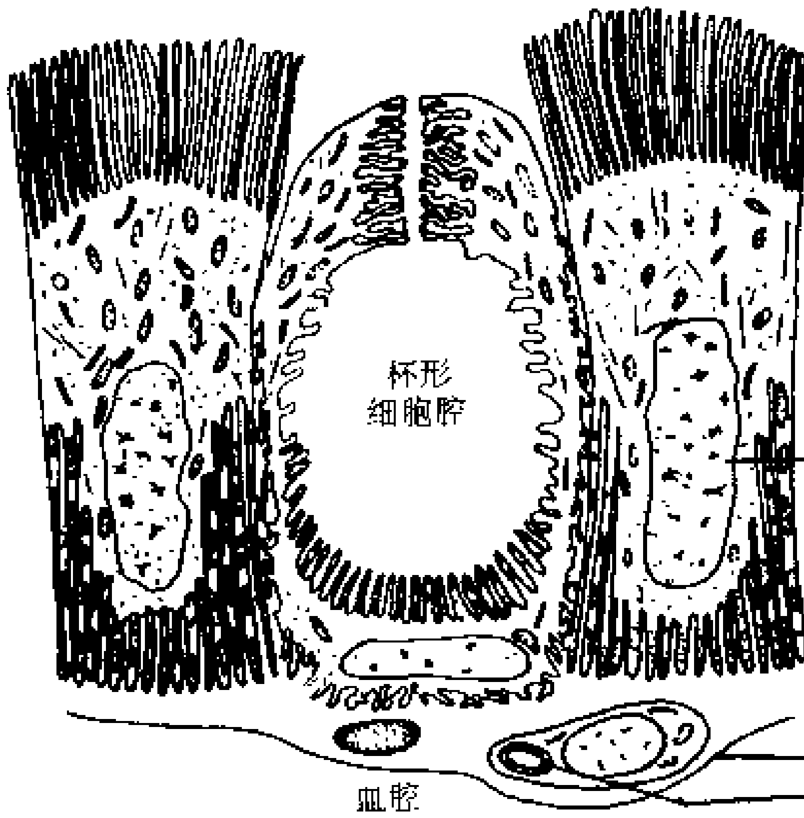



图 1-5　天蚕蛾幼虫中肠杯状细胞和柱状细胞模式图
(Anderoson 等，1966)

### 3.2　直肠细胞

直肠细胞的侧膜特化成侧膜堆。直肠细胞的大部分侧膜向胞质内多次折叠，形成复杂的梯状结构（即为侧膜堆），附近伴有大型线粒体，直肠细胞大部分空间被侧膜堆及其构成的不规则细胞间隙所占据。研究者认为，侧膜堆附近的线粒体能提供离子运输的能量，当血淋巴内离子主动输入直肠垫细胞间隙后，形成高离子浓度区域，肠腔中水和某些溶质能被动扩散进入细胞间隙，因此，众多的细胞间隙成为直肠吸收水分的贮存库（图1-6）。

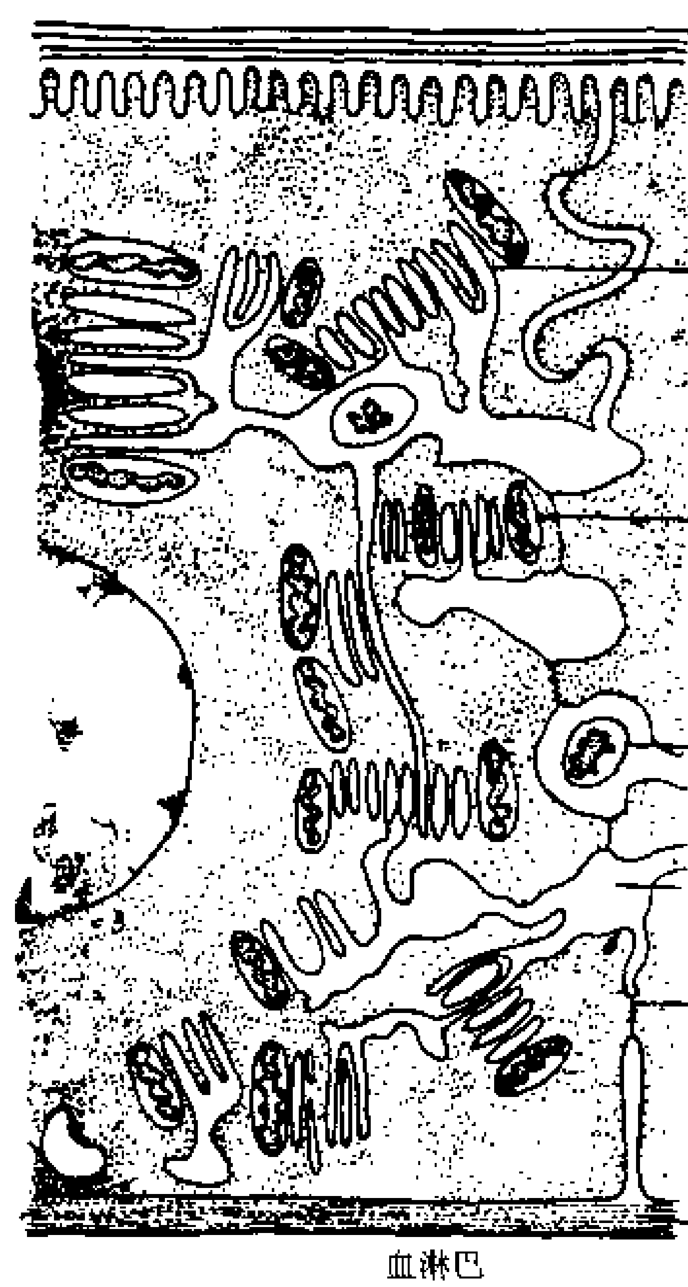



图 1-6　直肠垫细胞模式结构
(Berndege, 1970)

美洲大蠊（*Periplaneta americana*）的直肠垫是由多种类型细胞所构成的一个回吸水分的通道（图1-7）由主细胞和基细胞形成双层结构，靠肠腔一侧的表皮质内膜下是一层主细胞，内膜上的表皮极薄，有多处凹陷，是水和小分子物质进出的通道；第二层是连接在主细胞下的基细胞，细胞层较薄，外侧是血腔。直肠垫的周缘是长而薄的连

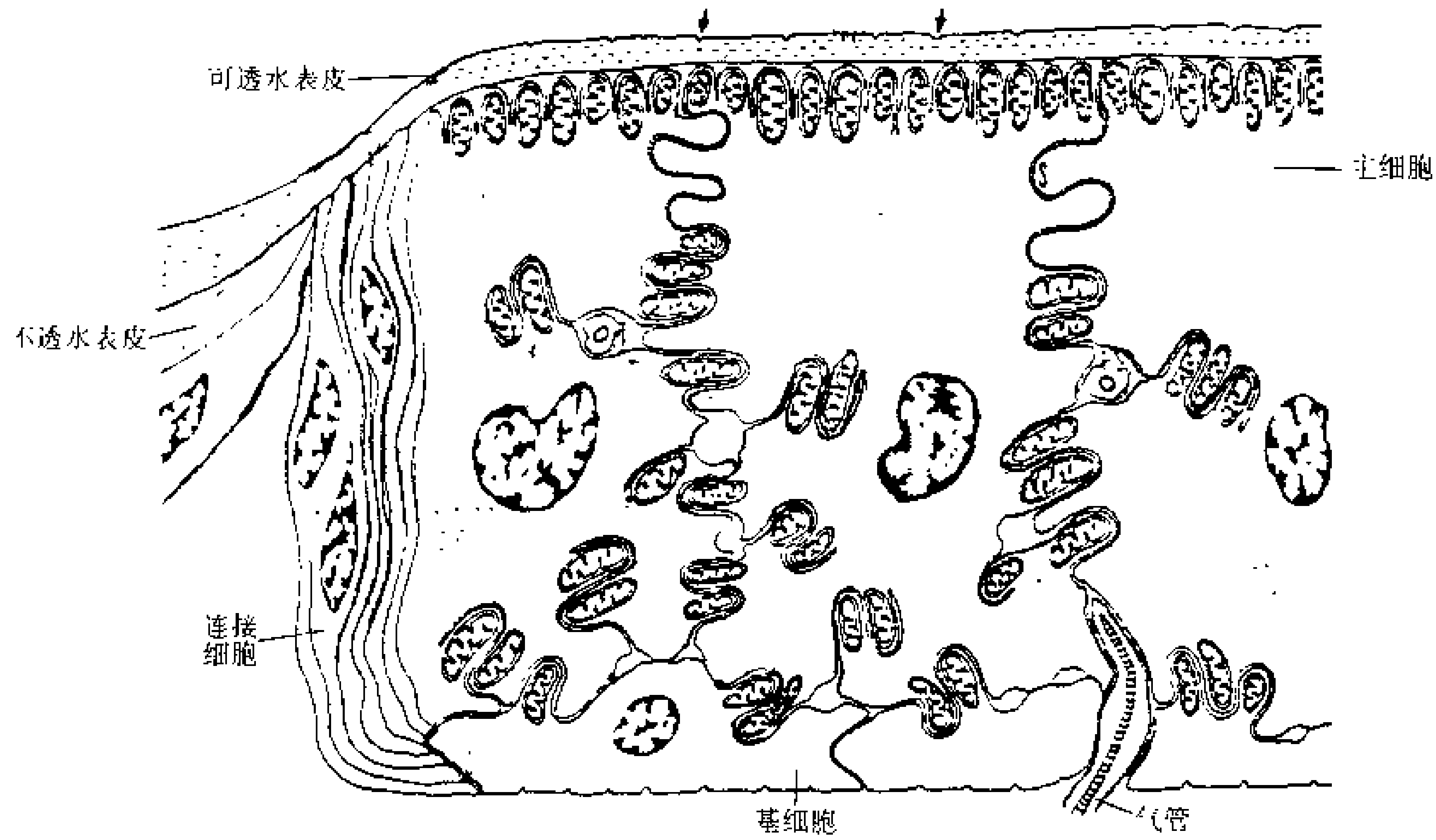



图 1-7　蜚蠊直肠垫的结构
（Noirot 等，1976）

接细胞，它是非渗透性的，顶端与表皮层相联接，成为直肠垫四周不透水的外壁。在主细胞间侧膜连接处形成侧膜堆并具大型线粒体。基细胞的结构比较简单，它的顶膜与主细胞的基膜相连接。在主细胞和基细胞中，都有大量的气管与微气管，保证氧的供应。在直肠垫以外的部位，肠腔内膜都是很厚的不透水的表皮层。

丽蝇（*Calliphora*）直肠乳突细胞侧膜特化，也构成调节水分和盐分平衡的典型结构。乳突顶膜外侧具有选择性穿透能力的表皮层，底部细胞有发达的基内褶，侧膜上有众多的膜堆，以及充分特化的细胞间隙。主细胞能从血腔中吸收离子，从而回吸肠腔中的水分

## 3.3　马氏管细胞

马氏管细胞质膜特化主要在顶膜和基膜。马氏管细胞顶膜向胞外突出形成微绒毛，马氏管端段细胞微绒毛长而致密，胞质内较多的棒状线粒体伸入其中，基段细胞微绒毛较短而稀疏，线粒体亦比前者少。马氏管细胞基部质膜高度向内褶叠，可延伸至细胞顶区，甚至达顶膜附近。由于基部质膜广泛内褶，在细胞基区形成许多细胞外隙。因此，马氏管细胞质膜特化形成的微绒毛，基膜内褶及外隙等结构，显著增加细胞表面积。在细胞质里有大量的线粒体为离子的主动运输提供能量。这些运输包括马氏管细胞从血淋巴吸收离子的主动运输，或者从马氏管细胞到血淋巴反向的离子运输。马氏管细胞质膜特化的微绒毛、基膜内褶及细胞外隙等结构在许多昆虫中均有发现，如鳞翅目、双翅目和半翅目等。

马氏管的端段细胞以分泌为主，基段细胞以吸收为主。随着功能的不同，它们的细胞质膜特化和细胞结构也有明显的区别。以分泌功能为主的端段细胞，基区是高度发达

的内褶，基膜外缘呈不连续状态，复杂的内褶形成多种形状的腔和槽，内褶中往往有线粒体。细胞中区有核、高尔基体、光面内质网和粗面内质网，线粒体较少，并有一些液泡和包涵体。面向管腔的顶区有大量充满线粒体的微绒毛。在分泌功能减弱时，线粒体会离开微绒毛；当分泌功能再次增强时又重新进入。有的微绒毛中还有囊泡。基段细胞的微绒毛形态和密度都与端段的不一样，一般比较粗短、稀疏，其中线粒体也较少。基区的内褶不多，线粒体较大，但数量少。

马氏管细胞之间的侧膜连接十分复杂，在电镜下可以看到曲折交错的侧膜，并有桥粒结构相连接。这种结构不但能阻断血淋巴中大分子物质通过侧膜间隙渗入管腔，而且在细胞之间可以广泛的进行物质交流和信息联系。

### 3.4 生殖腺缢缩

缢缩（constriction）是鳞翅目雄蛾中胚层生殖腺显著收缩段，其细胞顶膜极度伸长，构成蘑菇状内突，能有效地堵塞管腔，隔离各区段，避免分泌物彼此混合。在小地老虎（*Agrotis ypsilon*）、棉铃虫（*Helicouerpa armigera*）、黏虫（*Mythimna separata*）、弄蝶（*Calpodex ethlius*）、粉螟（*Anagasta kuehniella*）等鳞翅目昆虫中，雄蛾有 7 个缢缩。小地老虎的缢缩，分别位于雄性附腺—贮精囊、贮精囊—精包腺 1 段，精包腺 1～5 各段之间，精包腺 5 段—C 形管之间（图 1-8）。

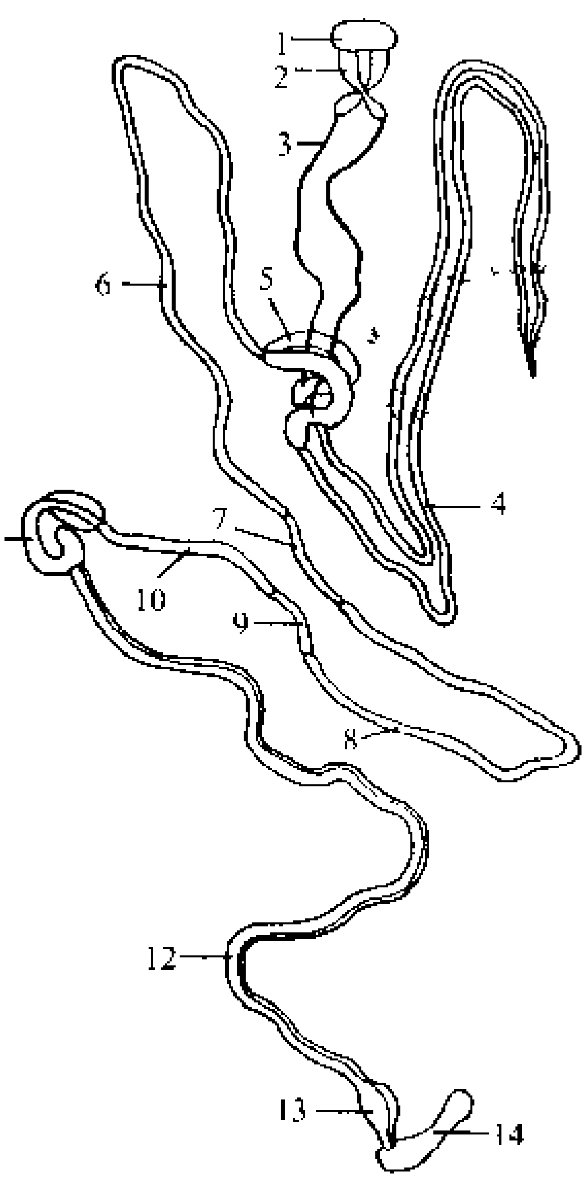



图 1-8 小地老虎雄蛾中胚层生殖腺的缢缩位置

1. 精巢 2. 修精囊 3. 输精管 4. 附腺 5. 贮精囊 6～10. 精包腺 1～5 段 11. C 形管 12. 铸颈管 13. 射精管球 14. 阳茎

（陈长琨、李国清，1998）

缢缩细胞顶区质膜极度伸长的微绒毛构成蘑菇突状瓣膜。小地老虎典型的瓣膜细胞特点是（图 1-9）：多数细胞伸长超过原长度的 1 倍以上，顶区膨大呈蘑菇状内突，纵横交错堵塞内腔；细胞质膜有二种微绒毛，蘑菇突微绒毛致密而细长，经计算蘑菇突平均直径为 6$\mu$m，表面积约 61$\mu m^2$，每平方微米平均着生的微绒毛 $2\times10^3$ 根，每个蘑菇突的微绒毛总数至少有 $1.2\times10^5$ 根。非突起顶膜的微绒毛粗短而稀疏，呈指状，直径是前者的 2～3 倍，微绒毛基部集聚较多的圆形或椭圆形的线粒体；细胞核的四周有致密的粗面内质网和稀疏的高尔基体，较多的微管和微丝，细胞间隙极发达。缢缩细胞特化的瓣膜结构赋予它隔离分泌物的功能。缢缩瓣膜细胞还有一些辅助特化结构，将有助于执行它的功能，如细胞内致密的粗面内质网能合成分泌物，对微绒毛的运动有润滑作用，发达的细胞间隙提供缢缩收缩和扩张的缓冲空间，微管和微丝保持细胞蘑菇突形状。




图 1-9　小地老虎缢缩臜膜细胞模式图

↑蘑菇突　BM. 底膜　ER. 内质网　L. 管腔　M. 线粒体

MV. 微绒毛　N. 细胞核　* 顶膜指状突

（陈长琨、李国清，1998）

## 3.5　视觉细胞

昆虫视觉细胞侧膜特化的视小杆是感光的功能性结构。视觉细胞为长柱形，它的侧膜向胞外突出的微绒毛的长轴与视觉细胞长轴相垂直，并交替或重叠排列融合，形成具有感光能力的视小杆。视小杆的微绒毛质膜上有视紫红质（rhodopsin），能感受 300～650nm 的光波。视小杆可分为闭合型和开放型。闭合型视小杆的微绒毛融合成中心纵轴，细胞体位于四周，如

蝶类；开放型的各视小杆相互分离（图 1-10）。

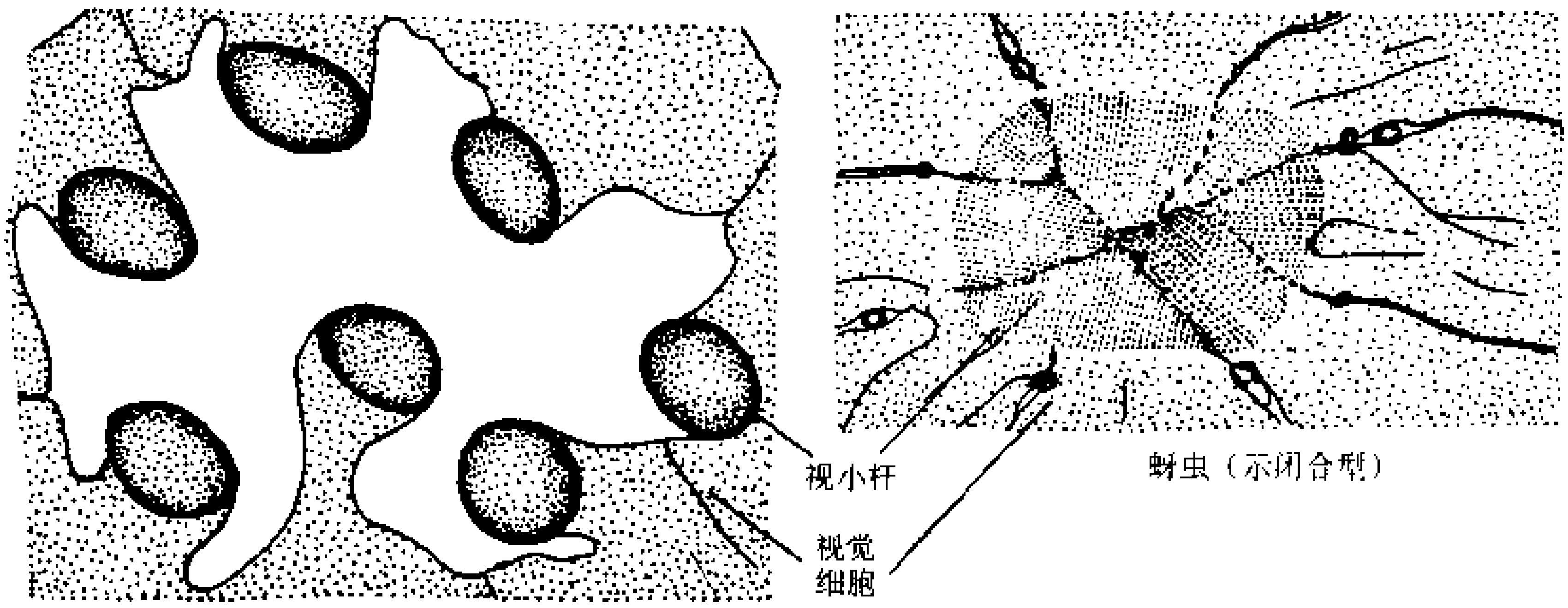



图 1-10 昆虫视杆的结构

（Wlken 1957，Golksmith 1962）

视小杆的质膜和周围细胞质膜相比，既有极大的表面积，又有较高的折射指数，使光线落到视小杆上，转向下传播，增加被视色素吸收的可能性。视杆细胞能判断接受到的光线的生理角度和最终的光线强度。复眼中不同位置的视小杆，可能含有复杂的视杆定向功能，综合感受几个方向的光。从小眼横切面上可以看出，不同种类的视小杆区域性差异很大。视小杆面积之和对光线的总敏感度直接有关。夜出活动的蜚蠊具有较大的闭合视小杆，其面积比蜜蜂大 16 倍。白天活动的蝇类的视小杆虽属开放型，但它的接受面比蜜蜂大 2 倍，它在高速飞行时具有敏锐的视觉能力。

视小杆的结构特点影响感光效率。不同种类的昆虫，有些视小杆较长，直接与晶体相连接，有的视小杆较短，远离晶体，通过感觉细胞特化的晶丝与晶体相连。初级和次级色素细胞包围着视觉细胞和视小杆，它们能吸收、分散或折射进入相邻小眼视轴的光线。

## 4 昆虫表皮

表皮是外胚层分化的细胞顶膜外的表面结构，由细胞合成和分泌的大分子胞外基质构成，主要含有几丁质、蛋白质、脂类和色素等成分。昆虫的表皮包括体壁的表皮及其同源结构如前肠、后肠和生殖道的内膜，气管的螺旋丝，感觉器官的表皮特化结构等。它具有多种生理功能，体壁的表皮能支撑虫体、提供肌肉着生点、防止体内水分散失、阻止有害物质渗入体内；咀嚼式口器昆虫前肠坚硬的内膜，能磨碎食物，有物理消化功能；后肠的内膜保持较好的通透性，有利水分和离子的运输；气管的螺旋丝能增加管壁的强度和弹性，有利气体的流动等等。

### 4.1 体壁表皮

昆虫的表皮是由皮细胞分泌的，复杂的结构赋予昆虫奇特的外形和获得多种保护功能。当表皮限制虫体生长时，蜕皮激素启动皮细胞进行蜕皮生理活动，沉积新表皮，更换旧表皮。

### 4.1.1 皮细胞

昆虫皮细胞的形态结构因对表皮的分泌和消化的功能改变而呈周期性变化。皮细胞在蜕皮期间分泌作用较弱，顶膜与底膜平直，侧膜不明显，细胞核不清晰。沉积新表皮开始时期顶膜弯曲，常有原生质丝突入表皮层内，侧膜出现，胞核明显。在溶离旧表皮与沉积新表皮期间，细胞的合成、分泌和吸收都很旺盛，这时顶膜微绒毛发达，基膜褶深陷，底膜也常随基膜一起内陷，并有血淋巴进入到内褶中，增加了基膜与血淋巴接触机会和吸收面积。核出现清晰的双层膜，核内有电子致密的大型核仁与电子致密度较低的染色质，部分染色质与核膜相连。胞内细胞器数量增多，出现众多的核糖核蛋白体、粗面内质网，线粒体和高尔基体，并有大量电子致密的颗粒物质，以及微管和微丝（图 1-11）。

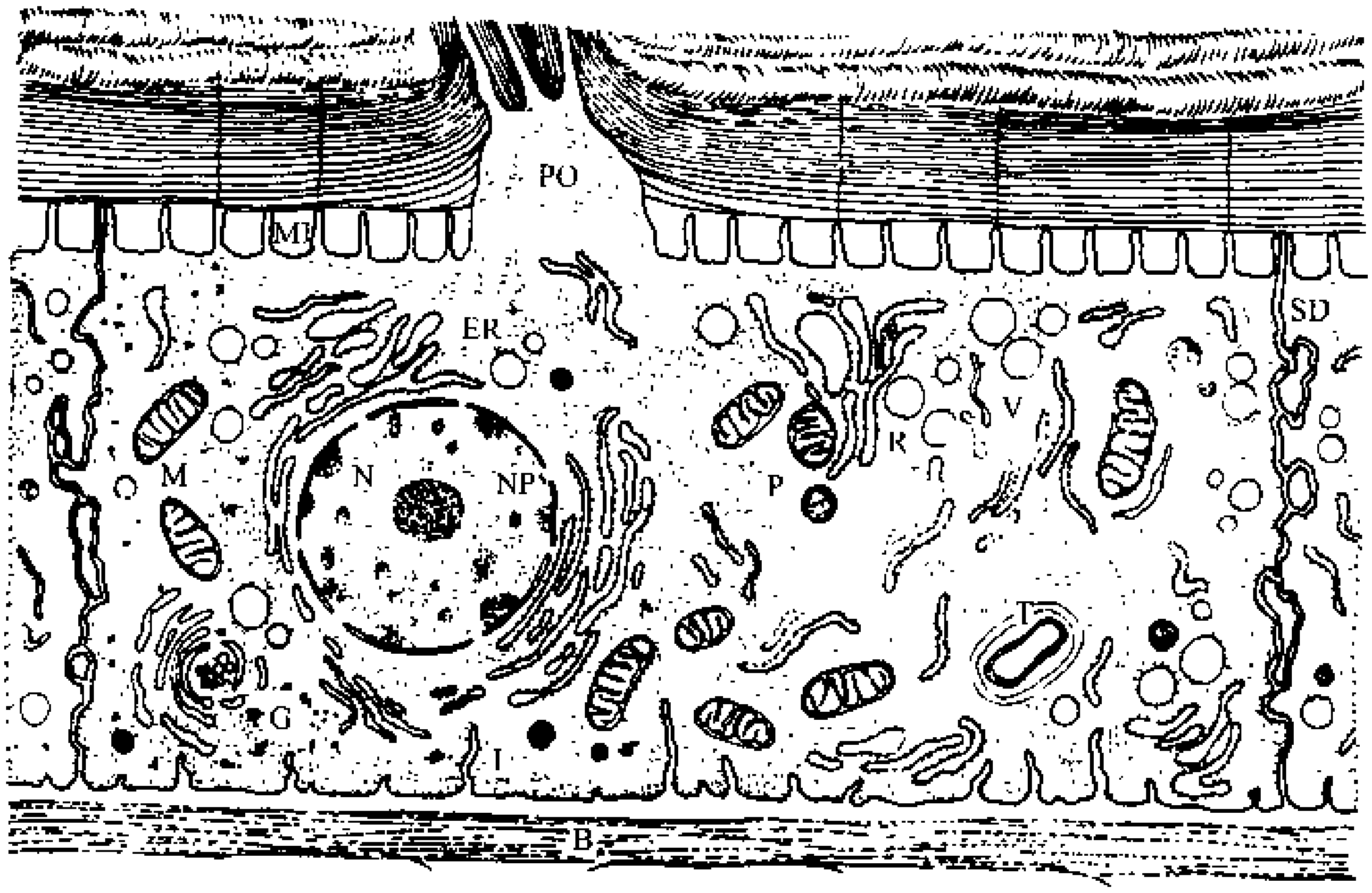



图 1-11 昆虫皮细胞的模式结构

B. 底膜 ER. 粗面皮质网 G. 高尔基体 I. 基膜内褶 M. 线粒体 MI. 微绒毛 N. 细胞核 NP. 核孔 R. 溶酶体 P. 色素颗粒 PO. 孔道 SD. 侧膜 T. 微气管 V. 囊泡

（森精，1971）

### 4.1.2 表皮

表皮的基本组分是上表皮和原表皮。原表皮部分或全部鞣化成为坚硬的外表皮，未鞣化的则为内表皮。在有些昆虫中，外表皮与内表皮之间还有一层中表皮。表皮层中分布有大量孔道和蜡道。在昆虫生长、发育和变态过程中，因表皮限制、特定时期的生理代谢，故发生周期性的蜕皮，已成为生命活动的一个重要环节。皮细胞必须降解旧表皮，回吸可利用的化学成分，重新沉积新表皮，脱去不能再利用的旧表皮部分。

4.1.2.1 上表皮 上表皮(epicuticula)是形成表皮时细胞最先分泌的一层，也是表皮的最外层，由若干性质和功能不同的亚层组合而成，一般分为黏胶层、蜡层、外上表皮层和内上表层。

黏胶层 黏胶层(cement layer)是上表皮的最外层,是皮细胞腺分泌物覆盖在蜡层上形成的,它具有保护蜡层的功能,因此又称护蜡层。黏胶层的主要成分是蛋白质和脂类,经过多元酚鞣化以后,性质相当稳定,类似于蜚蠊的卵鞘。在不同种类的昆虫中,黏胶层的差异极大,而且在虫体表面的分布和厚度也很不均匀。如蜜蜂属昆虫的体表不存在黏胶层;在有些昆虫的表皮中,仅局部覆盖有黏胶层;相反,在紫虲(*Laccifer*)表面,能分泌出大量黏胶物质,形成很厚的外壳,工业上把它作为造漆的原料,可制成虫胶漆片(或称蜡克)。黏胶层性质的变化影响到表皮的亲水性程度,吸血蝽成虫刚羽化时,黏胶层是亲水性的,在鞣化以后性质趋向稳定,并为蜡质所渗透,表面就变成疏水性的了。

蜡层 蜡层(wax layer)在黏胶层与外上表皮之间,主要成分是长链烃类和其他脂肪酸酯和醇,是皮细胞在临蜕皮前分泌的,然后扩散到虫体表面。一般认为蜡的合成是在蜡道内完成的,皮细胞只分泌它的前体物质。蜚蠊体表的蜡呈液状。在蜜蜂(*Apis*)、蜡螟(*Galleria*)和黄粉甲(*Tenbrio*)的表皮中,具有游离的二元酚类,能抑制不饱和烃的氧化,从而使初分泌的蜡保持流动状态。但大多数虫体表面的蜡是呈固体状态的。弄蝶科幼虫和蛹体表的

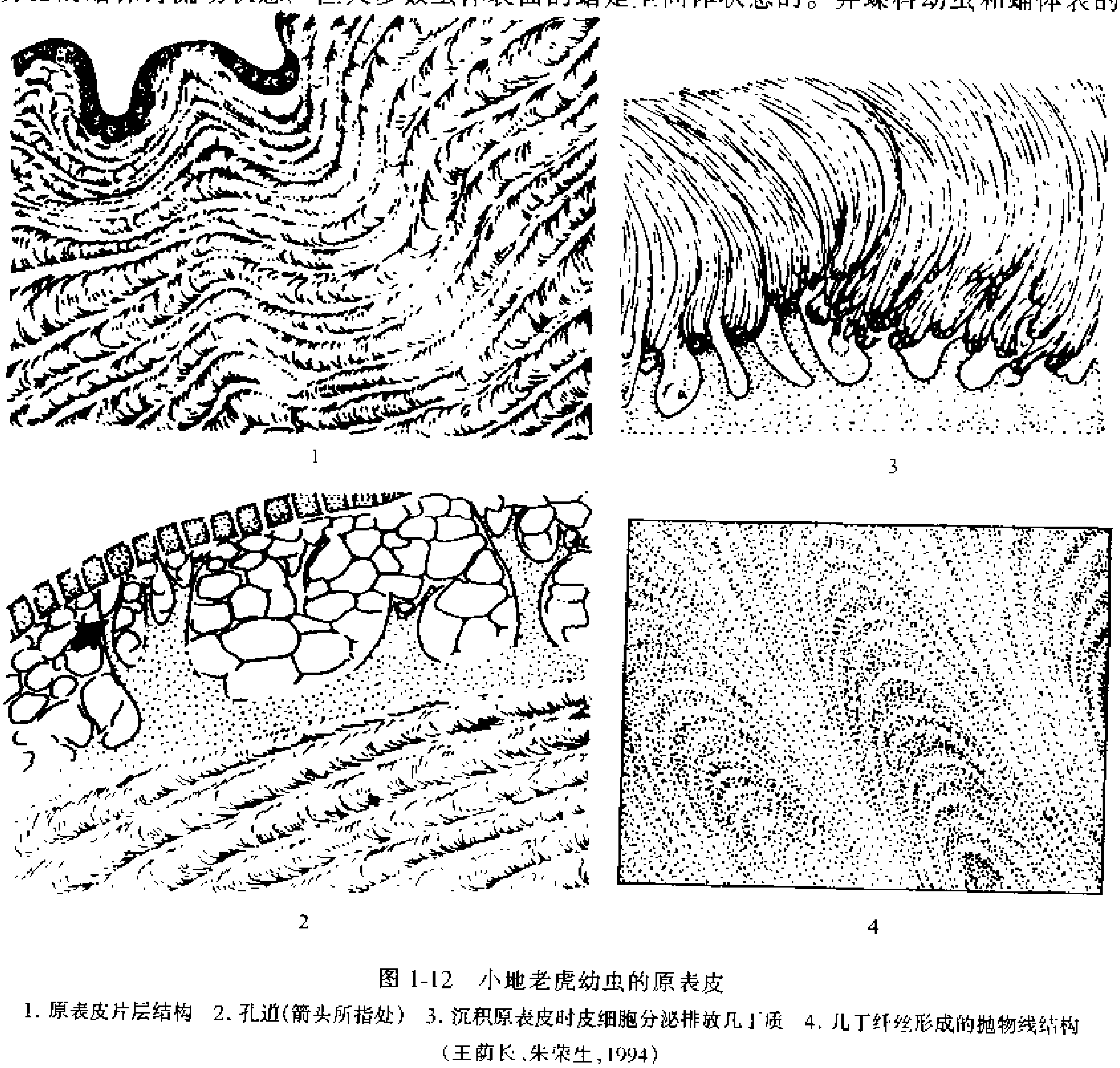


图 1-12 小地老虎幼虫的原表皮

1. 原表皮片层结构 2. 孔道(箭头所指处) 3. 沉积原表皮时皮细胞分泌排放几丁质 4. 几丁纤丝形成的抛物线结构

(王荫长、朱荣生,1994)

蜡并以蜡霜形式存在。蜡层具有防止虫体失水的功能，如果用溶剂或砂磨去蜡以后，蜡层防水能力受到破坏，昆虫容易引起失水死亡。

外上表皮层　外上表皮(outer epicuticle)，曾被命名为角质精层(cuticulin)，主要成分是脂蛋白，被醌鞣化以后性质十分稳定，很像聚乙烯多聚物，具有高度抵抗降解的能力，但真正的化学成分至今尚未彻底搞清。外上表皮是皮细胞最先分泌形成的一层，也是所有昆虫上表皮中普遍存在的一层(包括气管内膜与肌小腱附着点在内)。皮细胞在产生外表皮时，先以膜斑形式沉积到顶膜外侧，然后再愈合成为连续片层。稳定的外上表皮，有孔道与皮细胞相通，在吸血蝽(Rhodnius)和弄蝶(Calpodes)的外上表皮上，孔道直径约 3nm。在消化旧表皮时，皮细胞分泌的蜕皮液通过孔道，向外排放，同时吸回旧内表皮的消化物。外上表皮能阻止蜕皮液的内流，因而新形成的原表皮不会受到酶的作用而被解离，这种定向效应归功于外上表皮的选择性通透屏障作用。

内上表皮层　内上表皮(inner epicuticle)在上表皮中占相当大的比例，以较高的折光指数与外上表皮相区别，其结构致密，主要成分是脂蛋白与多元酚的复合体。因此又称为“多元酚层”(polyphenol layer)。多元酚的存在使上表皮具有较大的折光率，其中还发现有多元酚氧化酶，在修复伤口时具有鞣化受损的表皮的作用。

4.1.2.2　原表皮　原表皮(procuticle)是昆虫皮细胞最主要的分泌物，它构成体壁的绝大部分，主要成分是几丁质与蛋白质的复合体。几丁质是由皮细胞分泌的前体物在细胞外聚合而成的。前体物是几丁单体，它附着在细胞顶膜上，在几丁聚合酶的作用下，聚合成为几丁质微丝(图 1-12)。

皮细胞在分泌和沉积原表皮时，具有明显的节律性。因此，形成的结构具有很多片层，就像树的年轮一样，记录了昆虫的生长过程中的时间信息。所有片层中都是由连续的微丝或极小的颗粒构成的，片层两边呈平行排列，中间是抛物线型。根据这种现象，Bouligand 提出了抛物线型的模型。他认为每个片层中存在很多薄片，这些薄片内部由平行排列的微丝构成，每个薄片都以一定的角度进行旋转变换位置，若干薄片连续旋转 180°，便构成一个片层。当所观察的切面与片层呈一定的倾斜度时，就可看出平行纤丝与抛物线纤丝相间的构像，若观察的切面与薄片相垂直时，这种构像就转变成为不连续的颗粒状排列。以后 Wies-Rogh(1970)又提出了另一种模型，她认为抛物线型是连续分泌的微丝在片层内沿纵轴不断旋转的结果(图 1-13)。

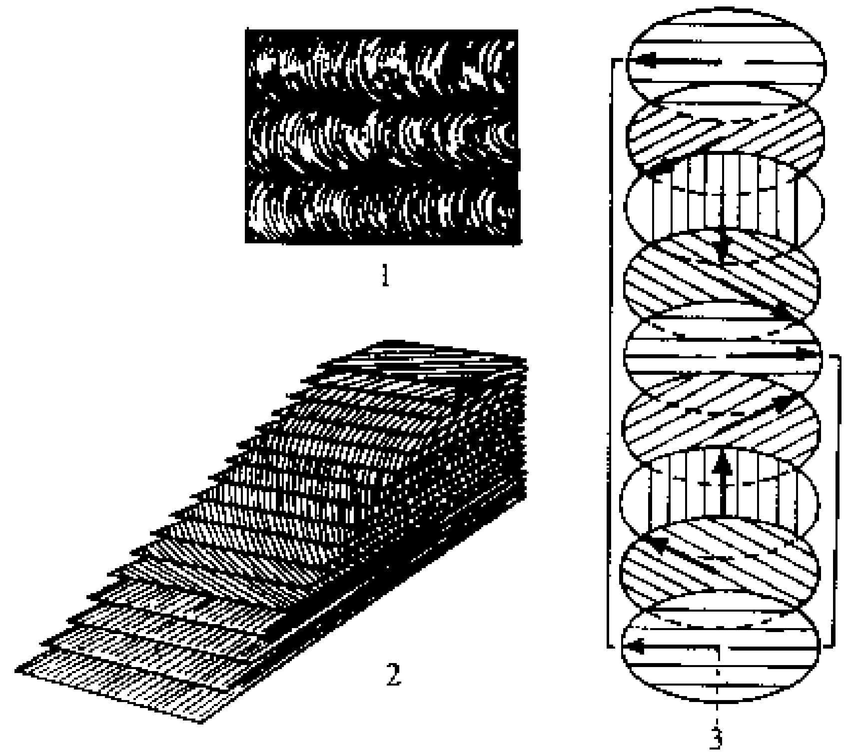



图 1-13　昆虫原表皮构型示意

1. 抛物线型中的几丁质纤丝与孔道　2. 片层中薄片与其纤丝　3. 薄片的旋转状态，由 9 个薄片组成一份片层

(Neville 等，1970)

原表皮经过鞣化除分化为外表皮(exocuticle)和内表皮(endocuticle)外，有的还存在中表皮(mesocuticle)层。外表皮是鞣化了的坚硬外层，对蜕皮液的酶解有很强的抵抗力，蜕皮时不会受到消化；中表皮

充满不鞣化稳定的脂类，结构与内表皮相似，具弹性；内表皮不鞣化，含有明显的片层，质地柔软有韧性，在蜕皮时与中表皮一起被酶分解。不少种类(如鳞翅目幼虫)的外表皮极薄，或不存在外表皮。

## 4.2　气管表皮特化

气管表皮特化内膜的功能与体壁的不同，结构和性质都有变异。扁平的管壁细胞分泌的表皮质内膜可区分为两层：①内层膜构成管腔的内壁，相当于体壁表皮的上表皮层，由鞣化脂蛋白和角质精层组成，无护蜡层和蜡层，它的疏水性脂类分子，均紧密排列在角质精层表面，分子的极性亲水基团插入层内，碳氢长链疏水基团朝向管腔，致使气管内壁呈疏水性，可以减少水分散失；②外层膜位于内层膜下方，相当于原表皮层，含有几丁质和蛋白质，几丁纤丝多数与气管的纵轴平行排列。




图 1-14　昆虫细胞内和细胞间的微气管
A. 雄蛾生殖道细胞内　B. 神经节细胞间
(陈长琨、朱荣生，1994)

气管内膜局部加厚，沿管壁纵向伸展形成紧密的螺旋丝，增加气管的强度和弹性，以承受呼吸时气体压力的变化。在呼吸量较大的昆虫中，气管膨大成薄壁的气囊，其内螺旋丝呈不规则排列，利于囊体大幅度收缩或膨胀，能扩大呼吸量，增加飞行的浮力，有助呼吸运动，为组织间气体交换提供了另一有效途径。昆虫微气管内也有螺旋丝，在昆虫许多组织和细胞内，如肌细胞、神经细胞和生殖道细胞等，微气管可伸入细胞间或细胞内，将氧直接送到线粒体附近，保证线粒体能量代谢时有充足的氧气，使能源物质彻底氧化产生更多能量(图 1-14)。

昆虫蜕皮时，管壁细胞与皮细胞同样表现出蜕皮活动，消化吸收气管的旧内膜和分泌沉积新内膜。在气管纵干没有螺旋丝的连接部位断裂，成束气管旧内膜形成气管蜕从气门脱去。但微气管内膜不参与蜕皮过程，虫体每次蜕皮时，微气管与气管的连接处断开，由端细胞分泌和胶状物黏接新气管与微气管。微气管不蜕皮是一种呼吸生理适应性，可使虫体在

新、旧气管内膜分离的短暂时间内,微气管继续供应组织细胞的氧气。

### 4.3 消化道内膜

消化道各区段的功能不同,内膜形成结构有明显差异。消化道表皮质内膜与体壁表皮相似,也是由几丁质纤丝构成的片层结构(图 1-15)。在昆虫蜕皮时,肠壁细胞活动随蜕皮进程发生周期性变化,在消化吸收旧内膜后,分泌沉积新内膜,未消化的残余物以蜕的形式排出。

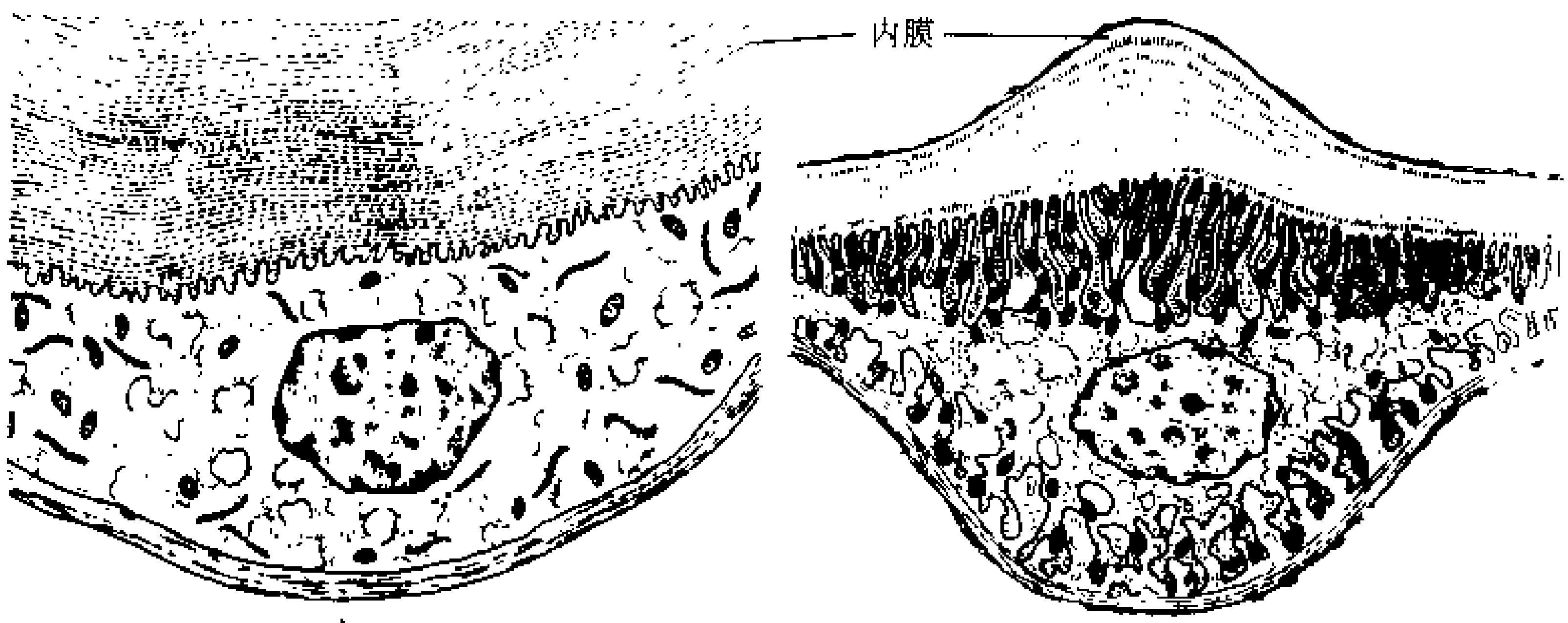



图 1-15 小地老虎前、后肠细胞的内膜
A. 前肠细胞 B. 后肠细胞
(陈长琨、王荫长,1994)

前肠内膜较厚,内表面分化成短毛或小刺,对消化酶和消化产物都表现不渗透性。取食固体食物的昆虫,前肠的前胃内膜形成板状或齿状突起,有助于磨碎食物和调节进入中肠的食物量。如东方蜚蠊(*Blatta orientalis*)前胃内膜特化成 6 个辐射状坚齿,能磨碎食物,坚齿下方还有两圈具毛的垫状突起,不但可作为活瓣调节进入中肠的食物量,还可将磨碎的食物再逆向输入嗉囊,使之与唾液混和进行消化分解。蚤类的前胃内膜特化成长刺伸向中肠前端,前胃有节奏的收缩,长刺穿破吸入寄主血液的血细胞,充分吸取血细胞释放的营养成分。

后肠的内膜较薄,利于对水分和离子的吸收。大多数昆虫的直肠细胞特化成瓣状和垫状乳突,突起顶部内膜较薄,而两侧加厚。如美洲大蠊(*Periplaneta americana*)由多种细胞构成乳突,主细胞外内膜较薄,有多处凹陷,是水分和离子进出的通道;而连接细胞外内膜为非渗透性的,构成直肠垫四周不透水的外壁。在直肠乳突以外的后肠细胞,内膜较厚,都表现出不渗水性。另外,着生在后肠前端的马氏管公共管细胞,表皮质内膜也较厚,表明马氏管公共管和后肠同起源于外胚层。

## 第二节 细 胞 器

细胞器是细胞质内有特定形态和功能的细胞分化结构,包括内质网、高尔基器、线粒体、微管和微丝、液泡等。各种细胞器在细胞的生命活动中既承担特殊代谢功能,又相互联系和密切配合。如内质网和高尔基器具有物质合成转化、包装和运输等功能,在它们执行功能时,必须由线粒体提供能量,微管和微丝参与运输。高尔基器和内质网产生的多种液泡,其

分泌物又通过液泡输出，它们的转化和更新过程溶酶体内水解酶起重要作用。

昆虫和其他动物一样，细胞具有多种细胞器。但由于昆虫组织结构的复杂性和生理功能多样性，致使内部系统某些细胞的细胞器，在形态、分布和功能上有其特性。如变态时脂肪体细胞的内质网和线粒体的数量和形态的系列改变；有翅亚纲和无翅亚纲昆虫精细胞内微管数目和组合的变化；迁飞性昆虫飞行肌细胞线粒体体积的增大和内嵴的复杂化。本节重点阐述昆虫细胞中与物质的合成和分泌、能量代谢和物质运输等有关的细胞器的特点。

## 1 内质网和高尔基器

内质网和高尔基器是细胞内膜系统内最多的膜系，并与其他细胞器膜（如线粒体、溶酶体）有密切联系。种类和功能不同的细胞，内质网和高尔基器的数量、排列和分布位置各异。即使是同一细胞，在各发育阶段亦因功能的改变，这两种细胞器的数量和形态也会发生较大的变化。内质网和高尔基器是合成蛋白质、酶类、脂类和糖类的主要场所，也是包装和运输合成物和分泌产物的主要渠道，还是膜更新的重要方式。在昆虫的许多组织和器官中，存在多种具有旺盛合成和分泌功能的细胞，它们的内质网和高尔基器均很丰富，如脂肪体内能分泌多种血淋巴蛋白的营养细胞，雄蛾生殖道能分泌构成精包蛋白的附腺细胞，蜕皮腺细胞分泌含多种水解酶的蜕皮液，以及分泌蜕皮激素的前胸腺细胞等等。

### 1.1 内质网的结构和功能

内质网是一种膜性管状或囊状结构，广泛分布于细胞内的封闭管道。这些管道多层交错重叠，形成许多扁平的腔、囊或池。内质网有两种类型：①粗面内质网，膜外附着核糖体颗粒，单个附着或多个集聚，多聚核糖体丛生或呈螺旋状排列，稀疏不一（图 1-16）；②光面内质网，膜外无核糖体颗粒，形态相近。两种类型内质网在昆虫细胞内分布数量和比例，皆因细胞类型、发育阶段和分泌状的不同存在差别。如雄蛾的生殖腺粗面内质网较多，前胸腺细胞光面内质网较多，但当两种细胞从分泌状态进入不分泌静止状态时，内质网均显著减少；脂肪体细胞随着幼虫龄期增长内质网数量增多，但进入预蛹期后内质网逐渐消失，转化为自体吞噬泡。

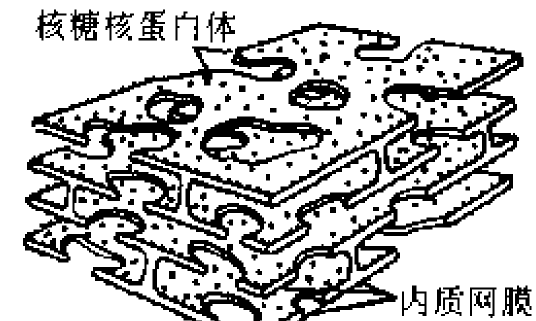


图 1-16 粗面内质网的立体模型
（Porter 等，1976）

粗面内质网的功能主要是合成蛋白质，并和光面内质网一样能合成脂类和甾醇。粗面内质网能合成多种外输蛋白，如酶原、黏蛋白、抗体及肽类激素贮存在膨大的内质网小池内，通过内质网上分离的小泡

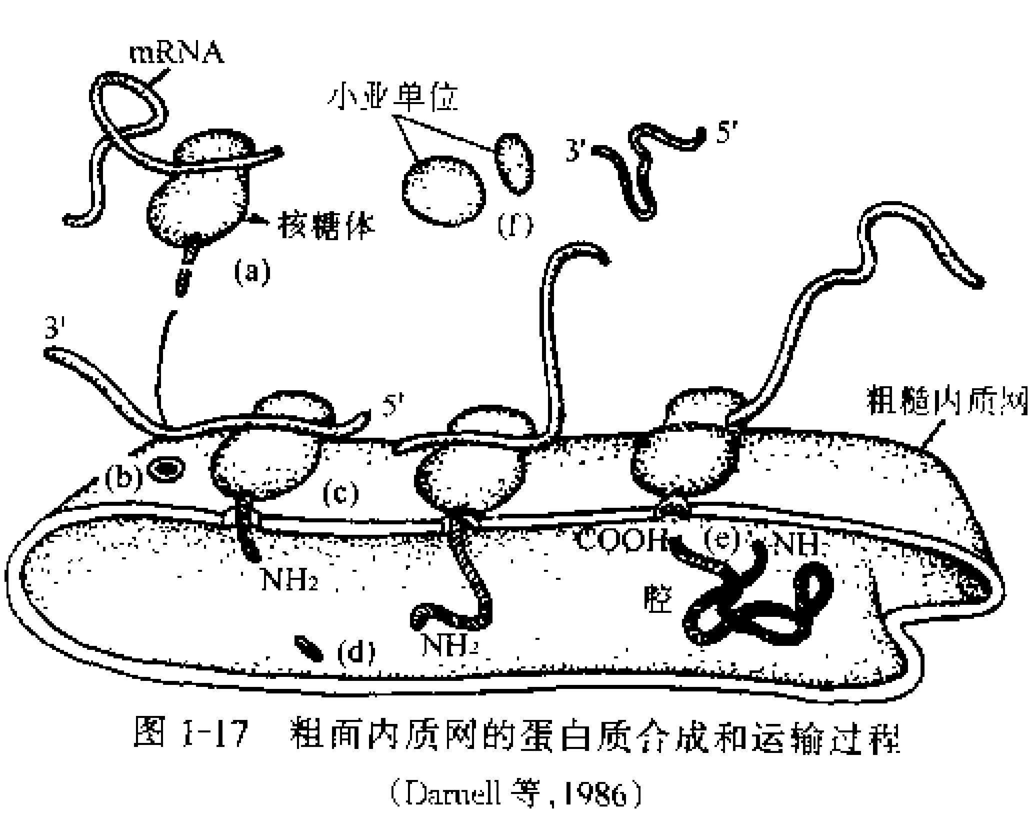


图 1-17 粗面内质网的蛋白质合成和运输过程
（Darnell 等，1986）

运送至高尔基体，再加工成各种分泌颗粒向胞外释放。

粗面内质网合成蛋白的过程(图 1-17)，“信号肽假说”(Signal peptide hypothesis)(Blobel 等，1975)，认为蛋白质合成从游离核糖体开始，当 N 端的信号肽延伸出核糖体后(a)，与粗面内质网膜上受体结合(b)，多肽链从核糖体大亚单位上长出、并进入内质网腔(c)，腔内的信号肽酶从新生肽链上解离信号肽(d)，新生肽链进入内质网腔(e)，待核糖体移至 mRNA 的停止密码子，即终止蛋白质合成，核糖体恢复到游离状态(f)。

光面内质网是合成脂类和甾醇的亚细胞结构，又具有运输蛋白的功能。磷脂是细胞生物膜结构的重要成分，光面内质网合成磷脂的过程如下：

脂肪酸＋磷酸甘油
↓酰基转移酶
磷脂酸
↓磷酸酶
胆碱＋甘油二酯
↓胆碱磷酸转移酶
卵磷脂

除此之外，各种细胞内光面内质网虽然形态相似，但其化学成分和结合酶系存在明显差异，因而功能不同。如在昆虫前胸腺细胞中，光面内质网主要参与蜕皮激素的合成；在脂肪体细胞中参与脂类代谢和转化；在肌细胞内，在肌节的收缩和松弛时，与钙离子的贮存和释放有关。

## 1.2 高尔基器的结构和功能

高尔基器又称高尔基复合体(Golgi complex)，由数目不等的高尔基体堆积而成。高尔基体以扁平囊状的潴泡为主体结构，及其由此产生的含有不流动物质的小泡(vacuole)，以及充满细胞液的液泡(vesicle)构成。潴泡的形态较多，但扁平囊面呈弓形，中央扁平，边缘膨胀。近核被膜和内质网的弓形凸面，接受新合成的蛋白质，称形成面(forming face)或顺面；反向弓形凹面能将接受的物质浓缩后，加工成小泡，继而发展成液泡排放，故称成熟面或反面(图 1-18)。

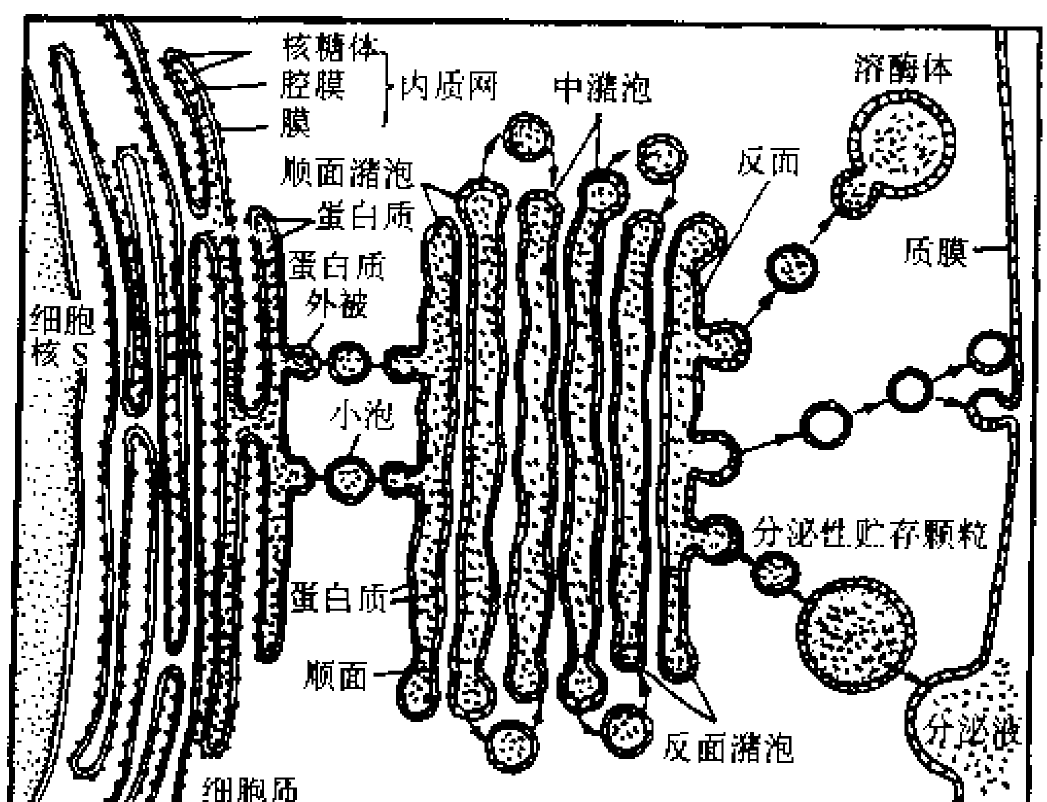


图 1-18 高尔基体潴泡的分隔及分泌物运送
(Rothman，1985)

高尔基器的主要功能是对粗面和光面内质网合成的蛋白质和脂类加工、浓缩和运输。高尔基潴泡叠片明显分为顺面潴泡、中潴泡和反面潴泡三个生物

性专一的功能区，蛋白质的运输由小泡载体沿着特定路线来实现。潴泡静止模型(stationary cisternae model)表明，粗面内质网分泌的蛋白质小泡，转移至高尔基体与顺面潴泡结合，由潴泡边缘芽生出小泡，将蛋白质从一个区域运送至另一个区域。在三个分隔的区域内，蛋白质受到不同酶的处理，如在蛋白质糖基化过程中，从内质网分泌的糖蛋白都具有相同的低聚糖链，经高尔基体各区隔酶处理，蛋白质糖链广泛加工和修饰后到达高尔基反面潴泡，再分别渗入溶酶体、分泌性贮存颗粒和质膜。

高尔基器在分泌细胞中最发达，分泌物的性质因细胞种类而异。如昆虫中肠柱状细胞的分泌小泡内，含有因昆虫食性需要的各种消化酶，包括蛋白酶、脂酶和糖酶等等；卵母细胞的分泌小泡含有的卵黄，为糖、脂和蛋白质的复合物；脑神经分泌细胞的液泡内，含有各种肽类激素，分泌泡的体积、内含物的电子密度和折光率随激素种类不同而异　即使同一细胞中也因生理功能的变化，分泌物的性质会发生改变。昆虫的皮细胞在蜕皮时旧表皮进入消化阶段，分泌物内含多种水解酶(如几丁酶、蛋白酶)；而在原表皮分化时，含有与表皮鞣化、骨化和暗化有关的多元酚氧化酶系为主的酶系。

### 1.3 昆虫内质网和高尔基器

内质网和高尔基器广泛分布于昆虫细胞内，与其他动物相同，在具有蛋白质合成和分泌功能的细胞内最为发达。如昆虫的脂肪体细胞是蛋白质、糖类和脂类合成部位，又是这些物质代谢和转化的中心；雄蛾的生殖腺细胞能周期性分泌大量蛋白质，为精包形成提供原料；鳞翅目幼虫的蜕皮腺能分泌含有多种水解酶的蜕皮液，在昆虫蜕皮时使原旧表皮的成分充分消化和再利用。

#### 1.3.1 脂肪体

昆虫幼虫和成虫期脂肪体的营养细胞中，内质网和高尔基器极其丰富。内质网排列成片层状，因受到较多脂滴的挤压，以致形成很多扁平的池槽。此外，细胞内线粒体、游离核糖体、糖原颗粒也很丰富。脂肪体细胞的结构特点，表现在它的旺盛代谢能力。脂肪体布满整个血腔，覆盖大部分器官，特别是消化道部位。这种空间排列形式，脂肪体细胞不但迅速得到被消化道吸收的营养成分，进行贮存和转化，又能及时分泌和运送至各种组织，供生理代谢之需。

脂肪体细胞既是糖、脂、蛋白质代谢和转化的中心，又是主要激素作用的靶标组织。脂肪体一方面具有分泌功能，为幼虫的生长发育和成虫卵子发生提供所需要的蛋白质、糖类和脂类等化合物；另一方面具有解毒功能，对外源有害物质进行解毒代谢。在蛋白质代谢中，脂肪体合成的蛋白质不断释放到血淋巴中，包括结构蛋白、载体蛋白、贮存蛋白、多种酶类、免疫蛋白和色素蛋白等。

脂肪体细胞的内质网和高尔基器等细胞器在变态时发生蜕变，形成多种形态的自体吞噬泡。在弄蝶、家蚕、小地老虎和棉铃虫等多种鳞翅目昆虫中，从幼虫进入预蛹期后，代谢功能由合成分泌转化为贮存。蛋白质代谢最为明显，血淋巴内蛋白质含量急聚下降，脂肪体细胞又从血淋巴内回吸蛋白质，使其胞内含量显著上升。从幼虫末期至前蛹期，脂肪体细胞因功能改变，结构发生显著变化，幼虫期条带状脂肪体至预蛹期集聚成团，细胞内充满蛋白质颗粒。蛋白质颗粒主要由内质网和高尔基器蜕变而成，首先正常的内质网和高尔基器发生

集聚，然后局部膨大成囊状，电子密度增高，随后内质网和高尔基小团进一步膨大和浓缩，最终形成自体吞噬泡。

### 1.3.2 雄性附腺

昆虫来源于中胚层的雄性附腺形态极为复杂。如蝗虫附腺由16根形态各异的管状腺组成；夜蛾附腺则2根，每根有不同的区段。雄性附腺的分泌细胞中多数具有丰富的内质网和高尔基器，腺腔内充满分泌物，表现出具有旺盛的合成和分泌蛋白质的能力。如小地老虎的雄性附腺细胞主要为内质网型，其特点为：发达的粗面内质网平行或轮纹状排列；高尔基体及其分泌泡成团集聚并分散于内质网之间，以细胞基区和中区为多；细胞顶区具稠密的微绒毛和较多的线粒体(图1-19)。

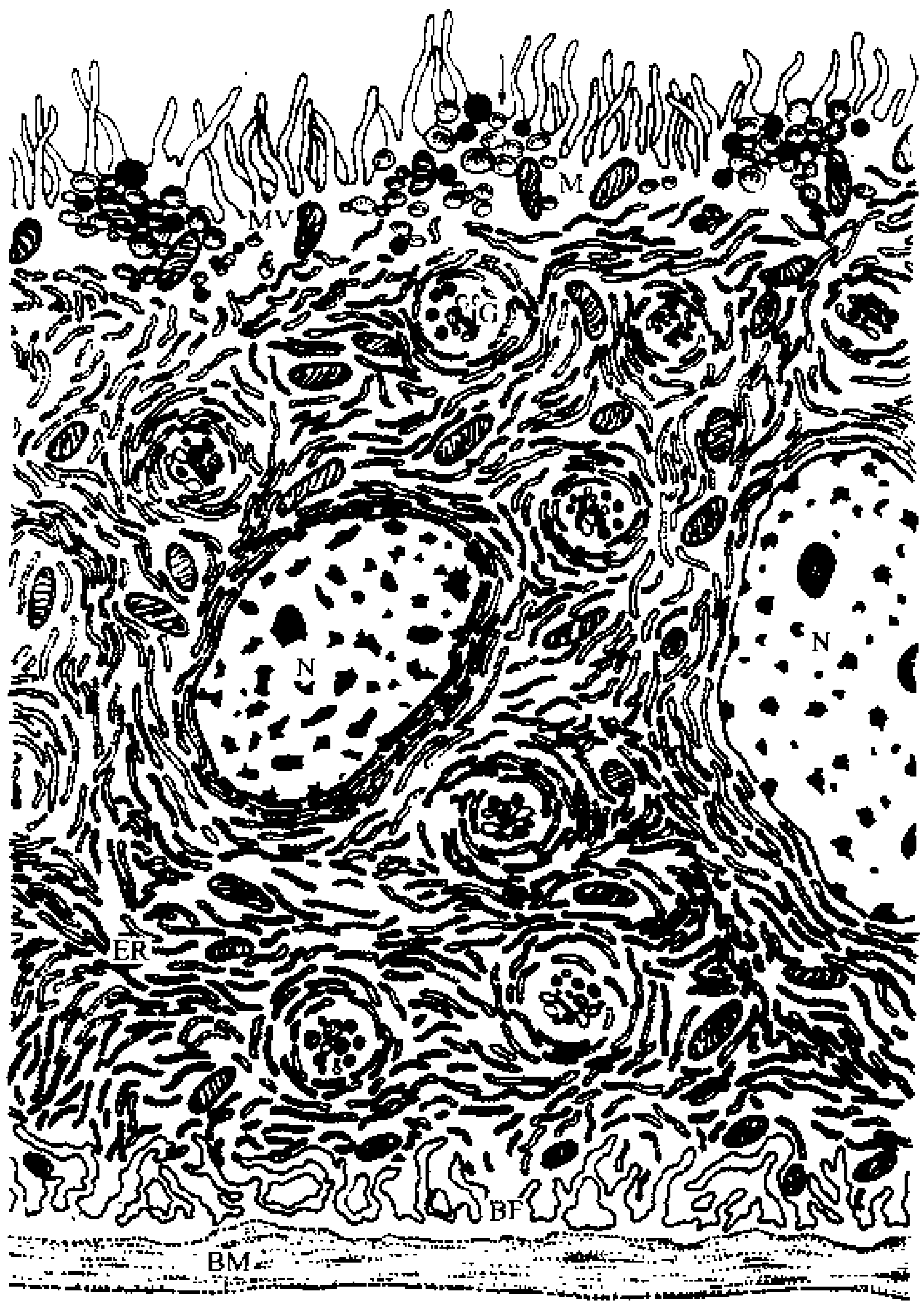



图1-19 小地老虎雄蛾附腺的内质网型细胞

ER.内质网 G.高尔基体 ↑分泌泡 M.线粒体 N.核 MV.微绒毛 BM.底膜 BF.基内褶

(陈长琨、李国清，1996)

附腺细胞内质网和高尔基器合成和组装的物质，以多种分泌形态和方式将分泌物从细胞顶端泌入管腔，分泌方式主要归纳为4种：①颗粒顶泌。黑色圆形或椭圆形颗粒状分泌物从细胞顶端排入腺腔。②液泡顶泌。具界膜的液泡分泌物从细胞顶端排入腺腔。③胞质局泌。细胞顶区局部与细胞分离后排入腺腔，中等电子密度的分泌物无定型结构，如絮状、网状或多液泡状，分泌量较大，内质网型腺细胞都存在胞质局泌现象。④胞间分泌。分泌泡从相邻细胞侧膜交界处出胞。分泌物的成分包括蛋白质、氨基酸、糖类和脂肪等多种(表1-1)。

**表 1-1 昆虫雄性附腺分泌物的化学成分**

(Davey，1985 录自各作者)

| 昆虫种类 | 分泌物的化学成分 |
|---|---|
| 蜚蠊 *Periplaneta* sp. | 脂类、尿酸 |
| 蟋蟀 *Teleogryllus* sp. | 前列腺素合成酶 |
| 家蟋蟀 *Acheta domestica* | cGMP |
| 沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* | 黏多糖、脂蛋白 |
| 蚱蜢 *Melanoplus* sp. | 蛋白质 |
| 吸血蝽 *Rhodnius* sp. | 黏蛋白、糖蛋白、胺类 |
| 日本丽金龟 *Popillia japonica* | 黏多糖 |
| 鳃金龟 *Melolontha* sp. | 糖原 |
| 大豆象 *Acanthoscelides obtectus* | 肽类 |
| 果蝇 *Drosophila* sp. | 脂酶、肽类、脂类 |
| 伊蚊 *Aedes* sp. | 蛋白质 |
| 家蝇 *Musca* sp. | 蛋白质 |
| 葱谷蛾 *Acrolepia assectella* | 蛋白质、糖类 |
| 柞蚕 *Antheraea pernyi* | 肽类、葡萄糖、海藻糖、糖原、丙氨酸、谷氨酸 |
| 家蚕 *Bombyx mori* | 前列腺素 |

附腺的多数种类分泌物质能在交配时形成精包，组成精液，为精子提供营养基质，使精子保持活性，还能在雌性生殖腔内形成交配栓塞，提高精子利用率。雄性附腺细胞旺盛的分泌能力，多种分泌物及复杂的生理功能，是昆虫高繁殖力的生殖生理需要。特别在具有多次交配习性的昆虫中，能为形成精包和组成精液源源不断提供原料，这也是害虫能在短时间内大量繁殖，极易暴发成灾的一个重要的生理因素。

### 1.3.3 蜕皮腺

蜕皮腺分泌细胞的内质网数量与幼虫的蜕皮有关。蜕皮前细胞处于分泌状态时内质网发达，蜕皮后细胞转为静止状态时内质网明显减少。鳞翅目幼虫的蜕皮腺是一种分泌蜕皮液的皮细胞腺，由小型的导管细胞和大型的分泌细胞组成。蜕皮前幼虫蜕皮腺的分泌细胞处于分泌状态时呈扁平皱缩囊状，胞质内含有大量的液泡，液泡间有致密的粗面内质网，液泡内充满蜕皮液。此时细胞膜上有许多内褶，膜内侧有许多圆形或椭圆形的线粒体（图1-20)。蜕皮后分泌细胞转入静止状态，腺细胞明显缩小，呈圆形，胞质液泡内蜕皮液排空，液泡间的内质网显著减少，细胞膜内褶消失。

蜕皮前后幼虫蜕皮腺分泌细胞内质网数量呈周期性动态变化，与分泌蜕皮液的功能有关。蜕皮液含有多种水解酶，如蛋白酶和几丁酶等，需内质网合成和分泌。当幼虫蜕皮过

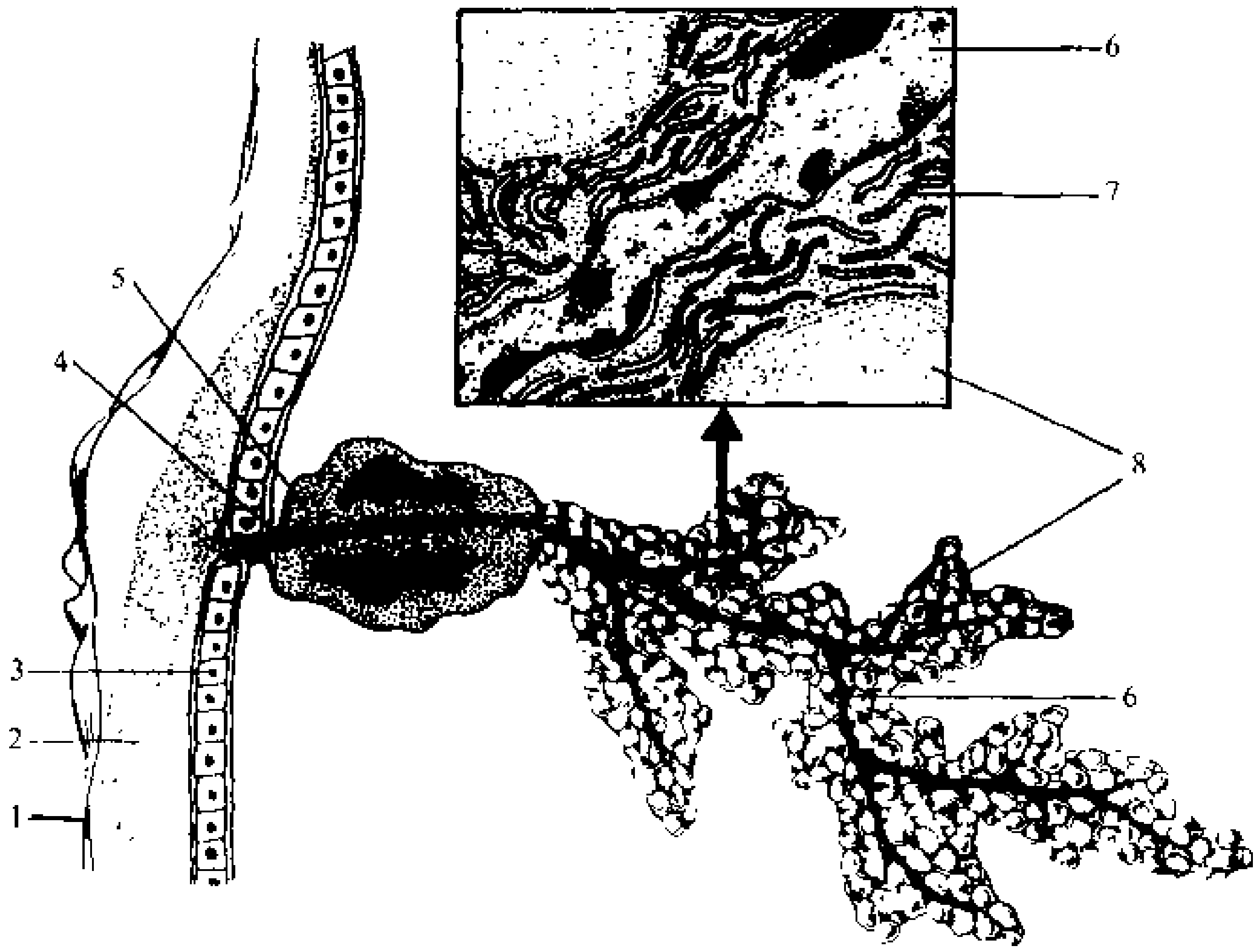



图 1-20 小地老虎预蛹的蜕皮腺及分泌细胞的细微结构
1. 旧表皮 2. 蜕皮液 3. 皮细胞 4. 导管 5. 导管细胞
6. 分泌细胞核 7. 粗面内质网 8. 液泡
(陈长琨、王荫长, 1992)

程需要蜕皮腺细胞分泌大量蜕皮液时，细胞内质网极其丰富。随着蜕皮过程结束，在蜕皮间期内蜕皮腺停止分泌蜕皮液，细胞的内质网显著减少。蜕皮液内大量的水解酶能消化旧表皮的几丁质和蛋白质，内表皮逐渐消化旧表皮的几丁质和蛋白质，内表皮逐渐消失直到片层的成分极大部分被分解为止。被分解的产物可被昆虫沉积新表皮时再利用。

蜕皮液在幼虫蜕去旧表皮时还具有润滑的作用。在小地老虎、黏虫、棉铃虫和家蚕等鳞翅目昆虫中，蜕皮液内除水解酶外，还含有丰富的多糖物质。蜕皮腺分泌的蜕皮液，注入新、旧表皮之间，起到润滑剂的作用，帮助幼虫从旧表皮脱离出来。尤其是位于气门附近的蜕皮腺，对旧气管的表皮从新气管中脱出有特别重要的作用。所以，鳞翅目幼虫的15对蜕皮腺中有12对位于气门的附近。

## 2 线粒体

线粒体是圆形、卵圆形或棒状的细胞器。它们是细胞进行氧化代谢制造 ATP 能量的重要结构。在不同类型细胞或同种细胞在不同的生理状态中，线粒体的形状、体积、数量、分布以及内部结构差异较大。分泌细胞的线粒体多数为圆形或椭圆形，均匀地分布在胞质内，为物质代谢和转化提供能量。但运输细胞的线粒体主要为物质的跨膜运输提供能量，所以集中分布在执行运输功能的细胞质膜部位，且形状变异较大。昆虫肌细胞的线粒体较大，呈长棒状，分布于肌原纤维之间；马氏管细胞中呈短棒状，位于顶膜微绒毛处；精细

胞中则位于鞭毛轴丝两侧。线粒体长度在 2～5μm，但在昆虫肌细胞中长度可达 50μm。

## 2.1 线粒体的结构

线粒体是由双层生物膜包围的囊状细胞器。具有一层外膜和一层内膜，两膜之间存在的间隙为外腔，内膜包围的腔为内腔。内膜很多部位向内折突成嵴，有效地增加了可溶性酶分子附着的表面。各种酶分子有顺序地密排在嵴上。外膜具小孔，可允许底物、辅助因子和线粒体产生的 ATP 通过，在线粒体和胞质间进行扩散（图 1-21）。

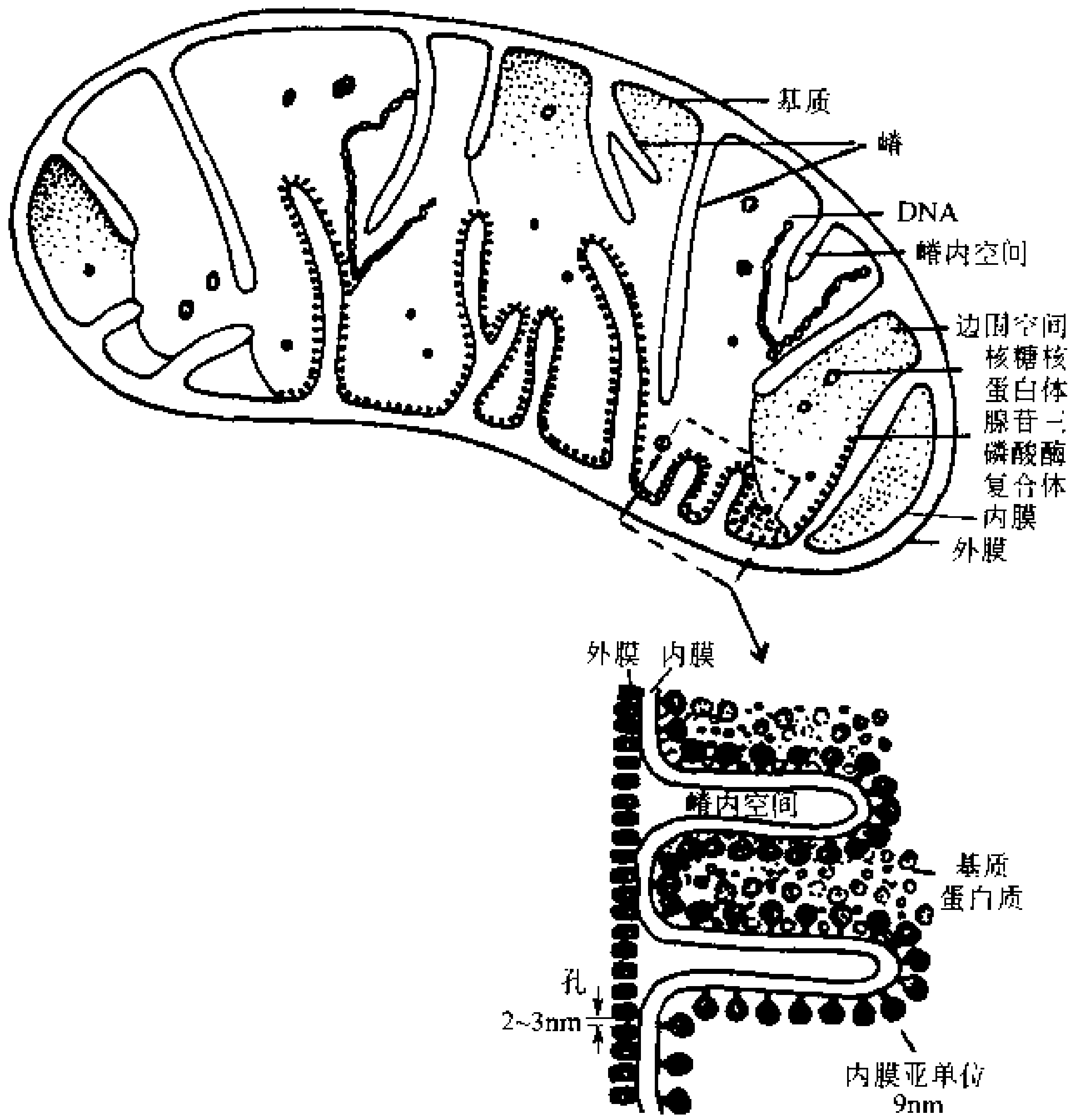



图 1-21 线粒体模式
（De Witt, 1976）

线粒体的外膜的内膜等部位分布不同酶系。细胞内进行生物氧化活动的 100 多种酶和辅酶分别位于其上、线粒体主要酶系分布的位置：外膜上有单胺氧化酶、细胞色素 C 还原酶、辅酶 I（NAD），膜间腔内有腺苷酸激酶、一磷酸核苷激酶、二磷酸核苷激酶和肌酸激酶；内膜有呼吸链酶系、腺苷三磷酸复合体；基质内有参与柠檬酸循环的酶、氨基酸代谢的酶、脂肪酸降解的脂肪酸氧化酶，以及在线粒体 DNA 上为复制、转录和转译编码信息用的各种酶。

线粒体基质内除含有多种酶系外，还有许多致密的基质颗粒，在运转离子和水分的那些细胞的线粒体内特别多。基质颗粒含有钙、镁、铁、锰及其他二价阳离子、磷和无机物。这些金属离子是线粒体酶系活动所必需的。此外，内腔还含有 DNA、RNA、核糖体、

糖原、脂滴和多种形态的结晶体。

### 2.2 线粒体的功能

线粒体是细胞内生物氧化的主要场所，也是细胞利用能源物质产生能量的“动力车间”和“酶储存库”。细胞内三羧酸循环、呼吸链电子传递和氧化磷酸化等产能过程都在线粒体内进行。细胞内物质如糖、脂和蛋白质，在细胞质内经代谢产生共同的中间产物乙酰辅酶A。乙酰辅酶A渗入线粒体内，进入三羧酸循环，彻底氧化后释放出氢离子和电子。脱出的氢和电子经由多种细胞色素酶组成的电子传递系统，传递给细胞内的氧分子，使之激活成离子状态并与氢结合成水，释放的能量使ADP磷酸化，生成含有高能磷酸键的ATP贮存于细胞内（图1-22）。参与细胞呼吸的反应物按一定路线进出线粒体膜。氧化磷酸化的底物如丙酮酸、脂肪酸、ADP和Pi，通过透性酶从细胞质进入线粒体基质，氧气从细胞质扩散进入线粒体基质。细胞质中糖酵解产生的，经穿梭系统进入基质到电子传递链。代谢产物ATP和二氧化碳透过内膜，由外膜的小孔进入细胞质。

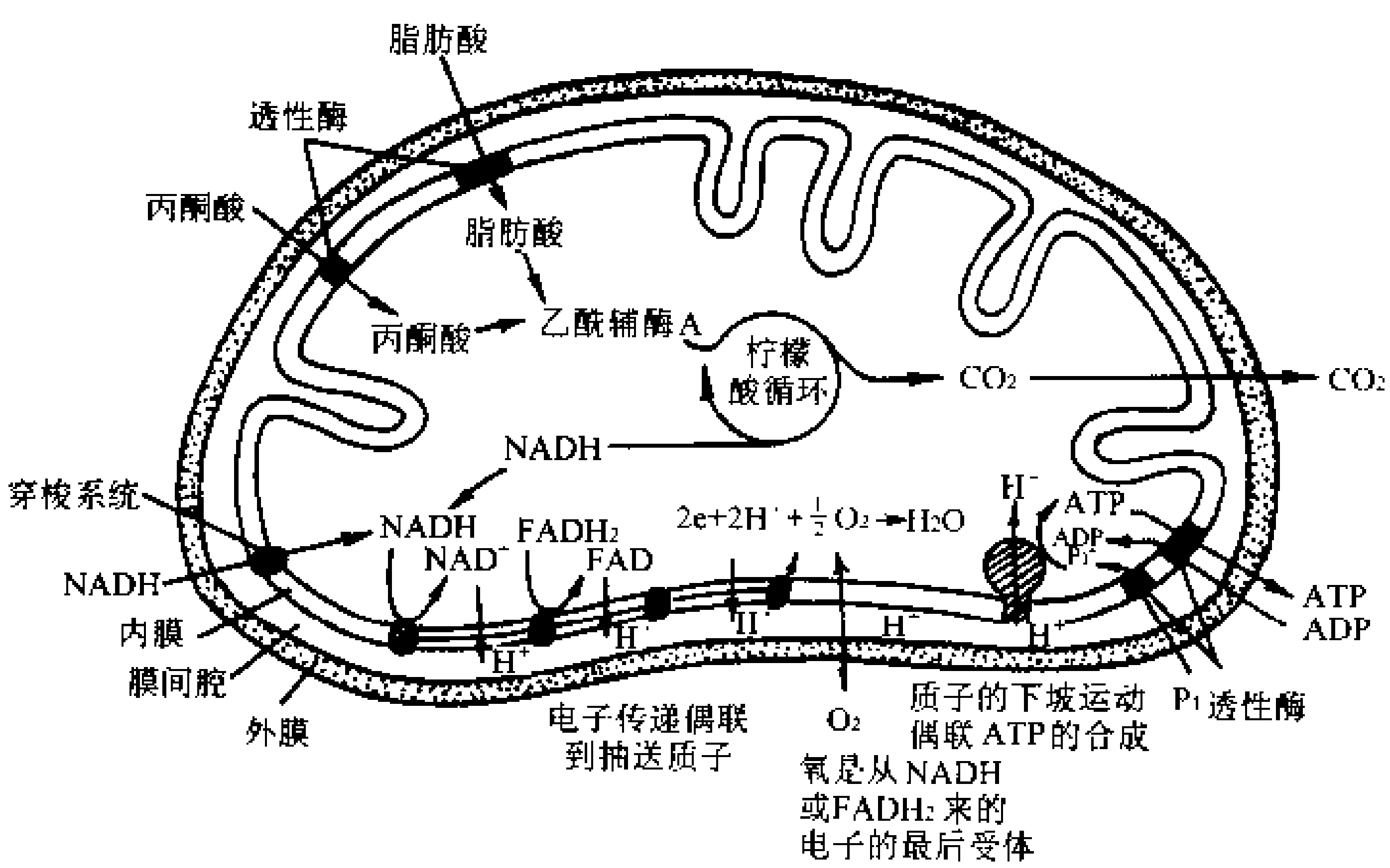



图1-22 线粒体内重要代谢反应及其代谢物进出
（Darnell等，1986）

此外，线粒体还参与脂肪酸氧化、转氨基作用以及氨基酸和蛋白质合成。细胞生命活动需要的能量，大约90%来源于线粒体。线粒体的生命周期比细胞短，必须不断更新。研究表明，线粒体有分裂、出芽及在基质内重新产生的现象。

### 2.3 昆虫的线粒体

昆虫线粒体的超微结构复杂性和数量多少，随细胞的功能活动而发生变异。在代谢比较缓慢的细胞中，线粒体的结构简单，数量少；在活跃的细胞中如正在合成物质、运转物质或将化学能转变为机械能的细胞内，线粒体的数量特别多，超微结构也比较复杂。线粒体在细胞内的分布情况并不规则，往往位于需要消耗能量的部位。如在肌细胞内，它们紧

贴在肌纤维之间，从而保证肌纤丝收缩所需的能量；在精子细胞内，主要分布在尾部的基部，供应鞭毛运动所需的能量。在进行主动运送物质的上皮细胞（如中肠、直肠、马氏管）的质膜内褶中，线粒体数量很多，并按一定规则进行排列。

### 2.3.1 飞行肌

线粒体在肌细胞中特别丰富，它整齐排列在肌细胞特殊细胞器——肌原纤维之间，是肌原纤维收缩时 ATP 的直接供应者。线粒体附近还有穿过肌膜的微气管，为线粒体氧化代谢提供充足氧气，产生更多能量（图 1-23）。

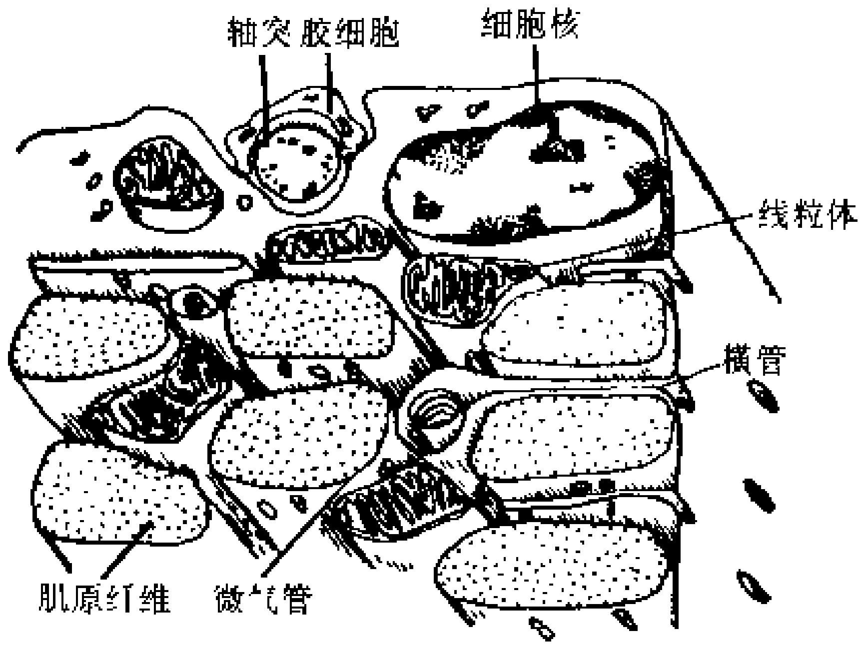



图 1-23 肌细胞的超微结构
(Pringle, 1975)

昆虫飞行肌细胞是一种高度特化的纤维状细胞。细胞内除线粒体和肌原纤维以外，其他所有结构与模式细胞相比，也有很多变化。肌膜是肌细胞膜，它的垂直内陷分化成的许多横向小管构成肌肉的横管系统（T 管系统）。这种横管系统能通过电扩散传递神经脉冲。在肌原纤维之间，有许多纵行的小管网络，构成纵管系统，是由内质网分化来的，因此又称肌质网。它们与横管系统连接，是贮存和释放钙离子的主要场所。

昆虫飞行肌的线粒体与其他组织细胞相比，不但数量多、体积大，而且嵴致密。如小地老虎、黏虫具有极强的飞行能力，刚羽化蛾肌纤维内的线粒体呈椭圆形或长椭圆形，排列紧密，成行镶嵌在肌原纤维之间，两个肌节之间一般有 3 个线粒体，内嵴致密整齐（图 1-24）。昆虫飞行肌活动量很大，线粒体含呼吸酶系数量，以及呼吸链和磷酸化系统组分明显高于其他组织。

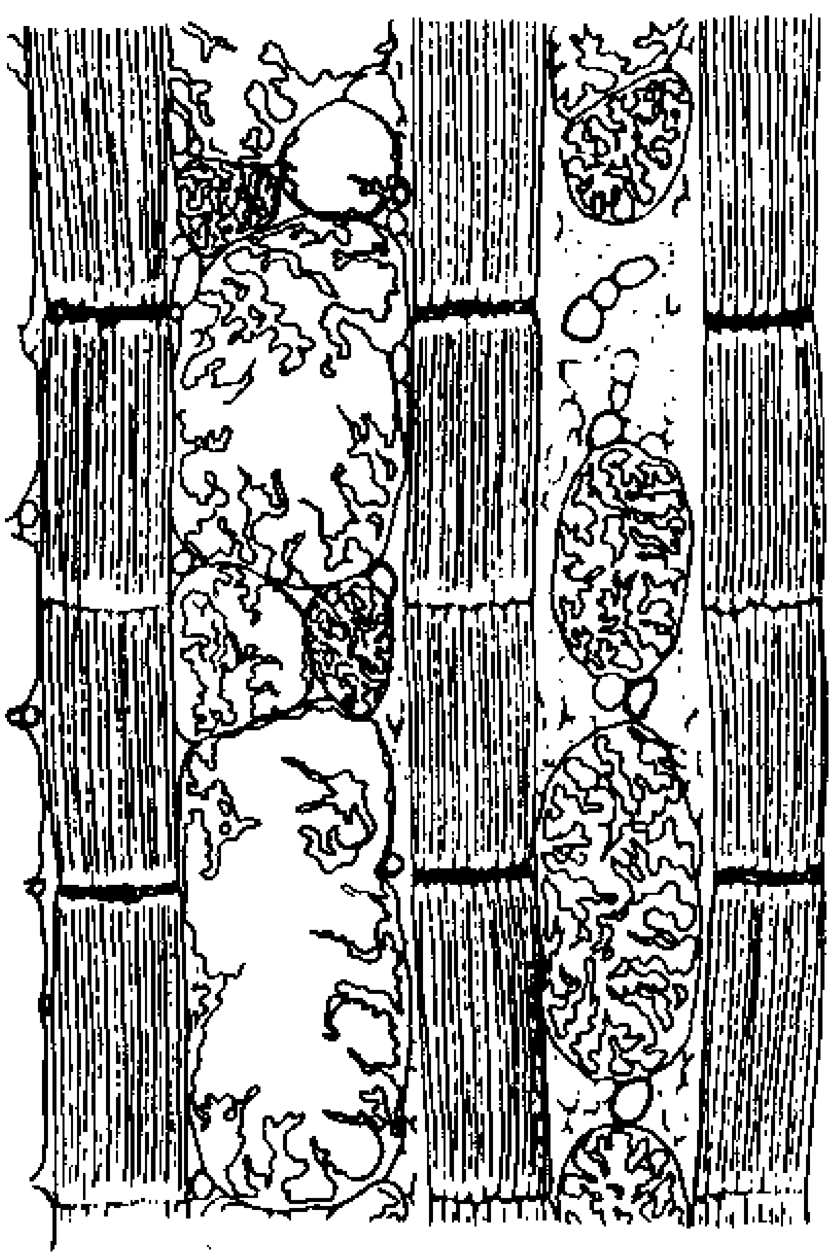


图 1-24 小地老虎飞行肌结构
(王荫长、朱荣生，1986)

### 2.3.2 精细胞

昆虫精细胞的线粒体形态已由椭圆形变成长形结构，位于轴丝两侧，为鞭毛的运动提供能量。在昆虫种间线粒体

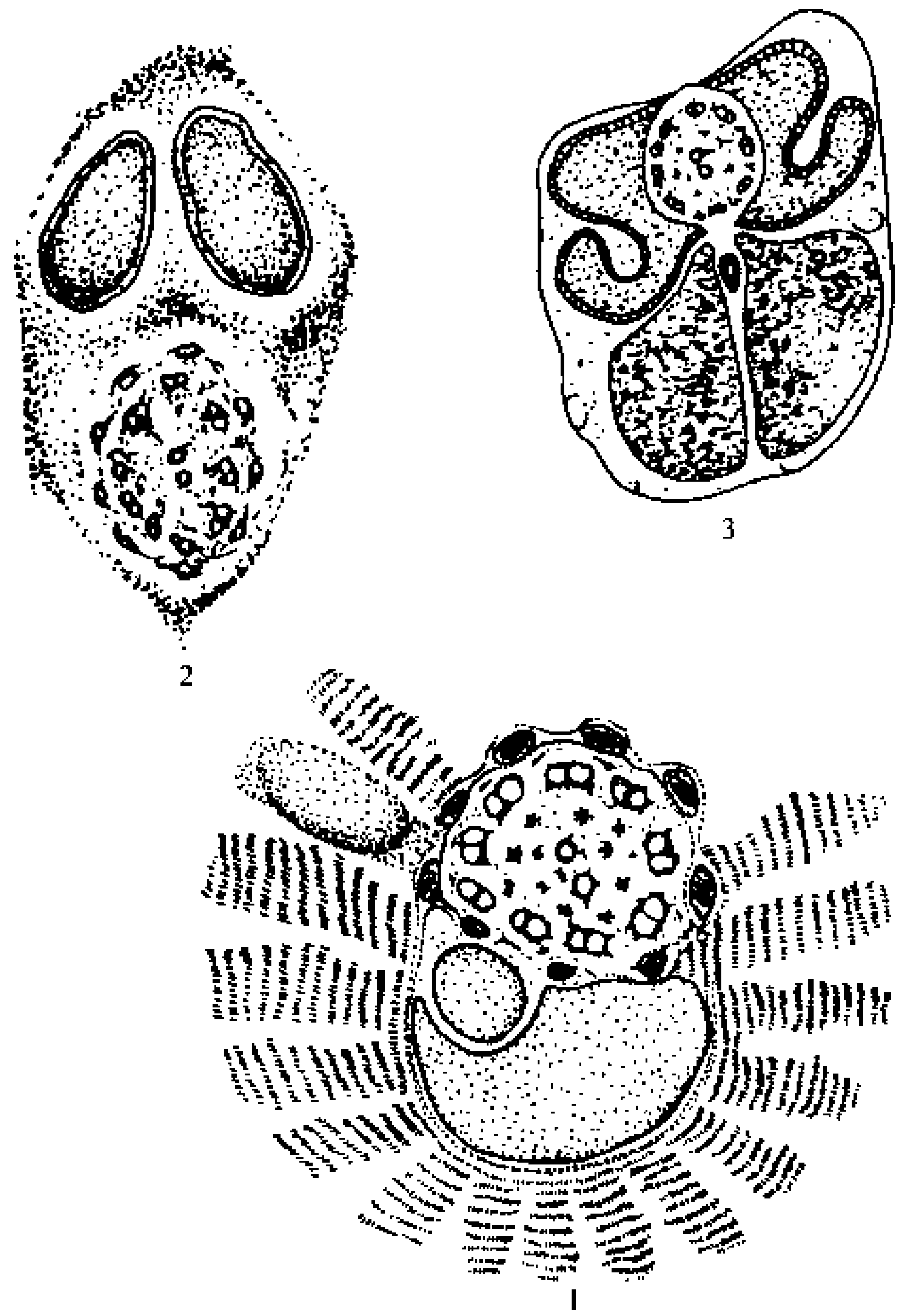


图 1-25 昆虫精子尾部横切面
（王荫长、卢中建，1994）
1. 小地老虎真核精子 2. 小地老虎无核精子 3. 褐飞虱精子

数量和细微形态变化较大。竹节虫总科昆虫的精细胞内则缺少。低等昆虫精细胞的线粒体形态与其他细胞的相比变化较小，故称常态线粒体，基质暗淡，无晶体物质，内嵴发达、具有明显的细胞色素氧化酶活性。在精细胞发育过程中，数量较多的小型线粒体逐渐合并重组，致使成熟精子内数量减少，如弹尾目 3 个、双尾目 2 个、蜉蝣目仅 1 个。

在多数昆虫中，精细胞内线粒体形态发生显著变化，称线粒体衍生物，亦称副核（nebenkern），基质内含致密的晶体颗粒，不存在与呼吸有关的酶类，细胞色素氧化酶仅存在短内嵴上。有翅亚纲昆虫的精细胞常有 2 个线粒体衍生物，形态相似或不同（图 1-25）。但在双翅目、毛翅目和缨翅目昆虫中，线粒体衍生物仅 1 个。精细胞线粒体衍生物演变开始于精原细胞末期至初级精母细胞前期，小而圆的线粒体融合成两极走向的长链；至减数分裂期线粒体成团均分于次级精母细胞，俟后在精细胞内发生一系列形态变化，直至线粒体衍生物形成。

### 2.3.3 马氏管与消化道

昆虫马氏管和消化道细胞内的线粒体主要存在于具离子泵的质膜部位。马氏管端段和基段的分泌细胞、直肠乳突细胞、中肠的杯状细胞和柱状细胞，皆有在血淋巴和管腔之间转移离子和水分的功能。因此，消化道内被消化的营养物质吸收进入血液，血淋巴内的新陈代谢废物能及时清除，保持稳定的渗透压，维持正常的生命活动环境。从生理功能分析，这类细胞可统称为“运输细胞”。

马氏管细胞的线粒体集中于细胞顶区微绒毛和基区质膜内褶的胞质内，细胞中区甚少，它能为微绒毛和基膜内褶的质膜上存在的各种离子泵提供能量。由此，Berridge 等根据细胞结构特点，即细胞的基膜内褶和微绒毛造成很多盲管，提出“静止梯度”模式理论，解释马氏管细胞对离子和水分的运输机制（图 1-26）。当大量的线粒体持续为离子泵

提供能量时，离子通过主动运输进入细胞基区的盲管后，建立局部的高渗区域，水分子即透过膜由低渗区进入高渗区，并进一步扩散至细胞顶区，再伴随顶区的离子运输注入管腔。线粒体使离子泵的连续工作，造成了一股可观的液流驱动力。

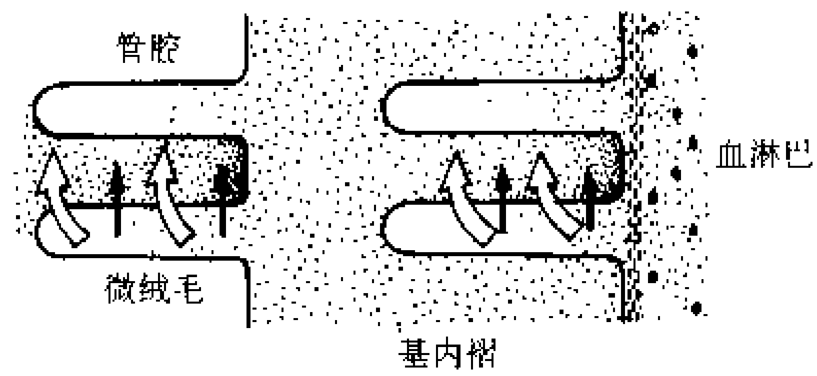



图 1-26 静止梯度模式图
(Berridge 等，1969)
箭头示溶质与液流方向，黑点密度代表溶液静止梯度

直肠细胞的线粒体位于侧膜，形成侧膜堆即高度发达的梯状连接——线粒体复合系统，在直肠垫中尤为明显（图 1-27）。丽蝇直肠垫具有回吸水分的能力，当离子从血淋巴主动运输至由侧膜堆形成的细胞间隙后，提高胞间小池的渗透压，造成直肠腔内水分和溶质流入细胞，继而大量水分流入血液。

在鳞翅目昆虫小地老虎隐肾内，马氏管端段存在一种线粒体型细胞，与典型的马氏管细胞形态差异较大。主要特征是中区充满线粒体，顶区无微绒毛，基区的基膜内褶亦不明显。从结构特征推测，这类细胞能为马氏管的排泄功能提供更多能量。

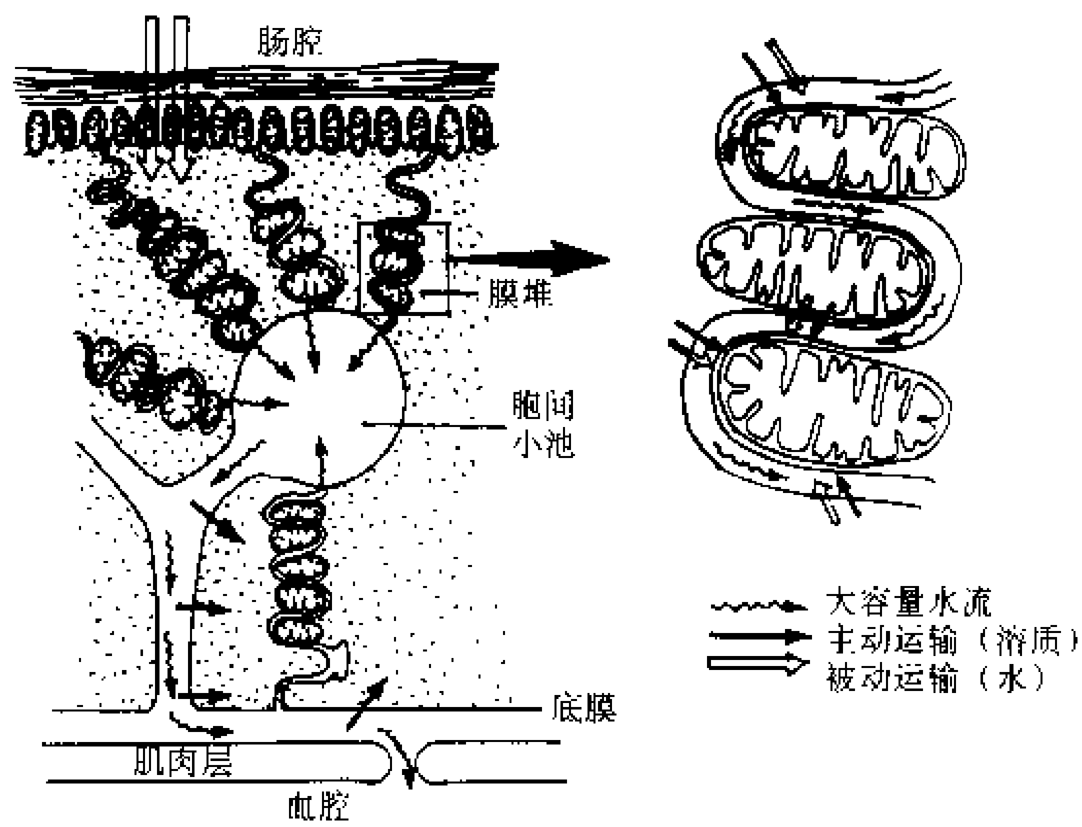



图 1-27 昆虫直肠回吸水分图解
(Berridge 等，1970)

中肠细胞的线粒体分布，因细胞功能不同而异。杯状细胞位于杯腔内顶膜的微绒毛内，而柱状细胞则位于基膜内褶。杯状细胞的线粒体为顶膜钾泵提供能量，如鳞翅目昆虫取食富钾食物，能通过杯状细胞分泌钾离子减少血淋巴内钾离子浓度。钾离子的跨膜运输不仅使肠腔侧的电位高于血淋巴，而且在离子运输过程中能携带较多的水分，从中肠后端渗入围食膜与肠壁细胞之间，形成由中肠的后端向前流向的体液流，从而提高了中肠对肠腔内被消化物质的吸收效率。

柱状细胞吸收离子和水分是与钠离子的主动运输相联系。柱状细胞基膜的通透性小于顶膜，当肠腔内钠离子被吸入胞质后，细胞基膜表面存在的钠泵及伴随的线粒体，可将细胞内的钠离子泵入血淋巴，钠离子主动运输将引起水分液流的移动。

## 3 微管和微丝

微管和微丝是细胞质内骨架的主要结构，普遍存在于真核细胞中。微管和微丝有特定

的形态结构，具有多种功能，在保持细胞形态、参与细胞运动、胞质成分运输、能量代谢和转换，以及细胞分化等方面起重要作用。自电镜制样采用戊二醛和锇酸双固定发现细胞微管后，随着生物技术的不断创新，对细胞质骨架研究进展很快。

### 3.1　结构和功能

微管（microtubules）是一种直形中空的细管，直径22～25nm，长度变化较大。微管横切面呈圆形，管壁由13条原纤丝集合而成，微管蛋白是含有α和β球型亚单位的二聚体（图1-28）。微管可单根存在或30～40根成束分布于细胞质内。微管之间通过细丝状横桥彼此相连，也可连接于其他的亚细胞结构，如质膜、内质网、线粒体和核被膜等。微管的主要功能有：①维持和控制细胞形状，在非球体的细胞内或细胞伸展部位，微管能保持其不对称的特殊形状，如神经细胞的轴突，直肠乳突的帽形细胞；②参与细胞运动，如昆虫精子的鞭毛，有多种微管组合形式，能产生多种运动图形；③运输胞内物质的通道，如将神经细胞内的各种递质运送至神经突触，神经—肌肉连接点和多种分泌腺等作用部位；④参与细胞分裂，在进行有丝分裂的细胞内，微管形成纺缍丝联结染色单体。

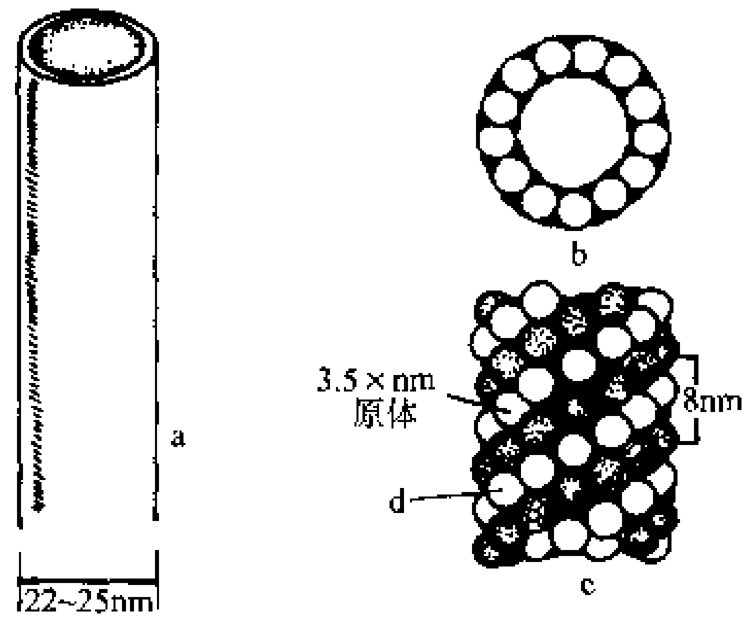



图1-28　微管模式图

（郑国锠，1992）

a. 整体　b. 横切面　c. 纵轴观示α和β亚单位三聚体

微丝（microfilaments）为实心的丝状结构，在不同类型的细胞中，它们的直径及功能存在差异。在非肌细胞质内密集成束或无规则分散；在肌细胞中构成具有收缩能力的肌原纤维。微丝主要分为肌动蛋白微丝和肌球蛋白微丝二种，前者主要成分为肌动蛋白，相似于肌细胞的细肌丝，后者主要成分为肌球蛋白，相似于肌细胞的粗肌丝。微丝具有收缩能力，在胞质内与微管共同承担保持细胞形态和参与细胞运动的功能。

### 3.2　昆虫的微管和微丝

昆虫的微管、微丝结构和功能与其他动物存在异同。昆虫的微管和微丝的骨架作用和运输功能与其他动物相同，如在神经细胞内主要是保持非球体形态和运送神经递质。昆虫肌细胞的肌原纤维的粗肌丝和细肌丝虽然蛋白质成分和构型与脊椎动物的相似，但粗肌丝和细肌丝排列组合不同。而昆虫精细胞的鞭毛微管的数目和组合变化较多，使昆虫精子有多种运动形式。

#### 3.2.1　精细胞

昆虫精子鞭毛的微管组合形式的变化赋予它多种运动形式。昆虫精子鞭毛的轴丝内主要有三种微管：副微管、双微管和中心微管。多数昆虫为9+9+2基本组成模式。许多昆虫微管的组成发生变化，原尾目昆虫的轴丝仅有12条或14条双微管，无其他构造；弹尾

目、革翅目、蚤目、缨翅目的轴丝内副微管消失，保持了9+2的低等精子类型；蜉蝣目昆虫缺少中心微管为9+9+0形式；尖眼蕈蚊（*Sciara coprophila*）的巨大鞭毛无中心微管，而有70条双微管和70条副微管呈螺旋形排列。

因轴丝微管组合形式的变化，昆虫精子运动是一种复杂的纤毛运动。它的复杂性是由精子鞭毛的支撑和伸缩的构造决定的。如虱目昆虫的9+2式轴丝精子，只进行简单的低频率波动，波长等于或大于鞭毛长度。多数昆虫具有9+9+2式微管的精子，运动时呈螺旋形波动，由波幅相等的两个波构成。具有9+9+2式微管和含有ATP酶附体的精子，能综合上述两种的波动形式。如黄粉甲的双螺旋直线轨道运动。精子运动的能量是由鞭毛复合体中糖酵解和线粒体内腔三羧酸循环提供的。能源物质主要来自精细胞形成时贮存在副微管内的糖原，一部分来自精液与受精囊分泌的糖类。无核精子可能有促进有核精子运动的作用。此外，精子的运动还受到含氧量、温度、介质中的氢离子浓度和渗透压的影响。

### 3.2.2 肌原纤维

肌原纤维（myofibril）是肌细胞特化的功能细胞器，这种细胞器由许多特殊的纵向微丝（蛋白质肌丝）聚合而成。它们与非肌细胞的微丝在形态结构、化学成分和运动机理等方面有许多相似之处。因肌原纤维中粗细不同的蛋白肌丝有次序的平行排列和相互穿插，使整个肌细胞，乃至整条肌肉呈现出明显的横纹结构。在偏光显微镜下呈现出明暗相间的带状构造，其中呈强双折射的称为暗带或A带，双折射较弱的称为明带或I带。在A带中间有一段相对较亮的区域，称为中带或H带，H带中央又有一条明显的暗线，称为M带。在I带中间也有一个高度双折射的狭窄区，称为Z盘（Z带）。肌原纤维在两个Z盘之间为一个肌节（sarcomere），这是肌肉收缩的基本单位。收缩蛋白纤丝主要有粗肌丝和细肌丝两种。粗肌丝位于A带区域，细肌丝起始于Z盘，跨过I带，向两边延伸，插入A带内达到H带的边缘，而M带则是粗肌丝中间点的连线，在这区域内不存在细肌丝（图1-29）。

昆虫肌肉中粗肌丝由单一的肌球蛋白（myosin）分子聚合而成。肌球蛋白是一种纤维状蛋白，分子结构呈蝌蚪状，分子尾部是1对α-螺旋形肽链，具有相互聚合形成粗肌丝主干的作用。头部有4根较短的肽链组成外突，具有两个活动中心：一个是肌动蛋白结合中心，能与肌动蛋白结合形成肌动球蛋白横桥；另一个是ATP酶活性中心，它在形成肌动球蛋白横桥时，分子构像发生变化而被激活，能水解ATP，释出能量，从而改变肌动球蛋白横桥的角度。因此，肌球蛋白分子具有三个重要性质：聚合成粗肌丝；与肌动蛋白结合，形成以横桥联结的肌动球蛋白；水解ATP，将化学能转变成机械能，为横桥处分

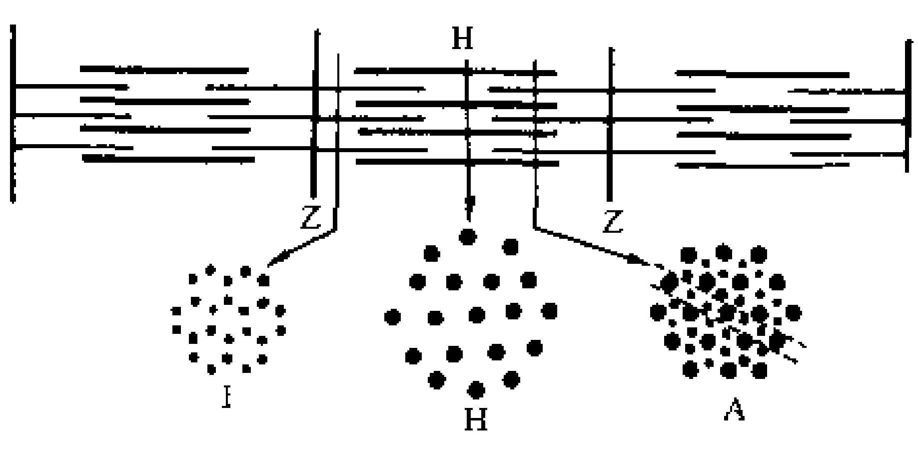



图1-29 单根肌原纤维结构及肌丝排列形式
上方示粗、细肌丝在肌原纤维内排列，下方为H区、A带、I带的横切面
（Tregear，1977）

子变构提供能量。每根粗肌丝一定间隔就有一个外突，但在H带中的粗肌丝不存在外突（图1-30）。

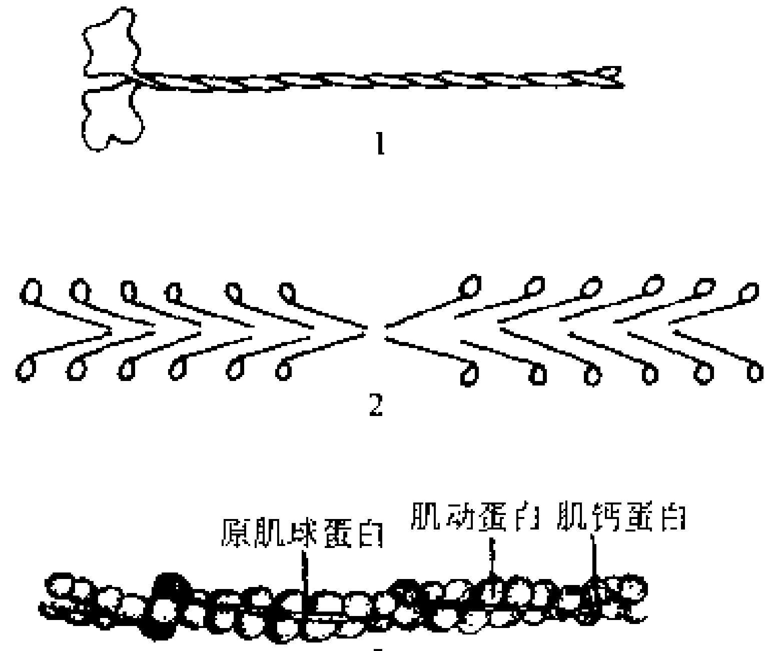



图1-30 肌丝中肌球蛋白和肌动蛋白聚合状况
1. 肌球蛋白分子结构 2. 肌球蛋白在粗纤丝中的聚合
3. 肌动蛋白在细纤丝中的结构
(Huxley等，1971)

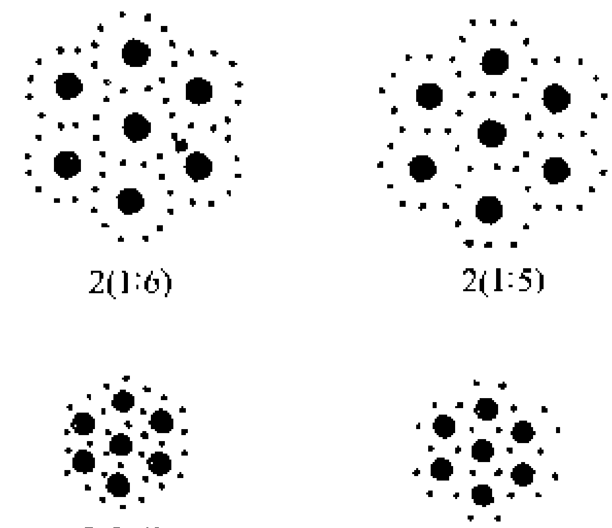



图1-31 昆虫肌肉粗细纤维的排列形式
1. 小地老虎飞行中粗肌丝与细肌丝1:3排列形式 2. 各种肌肉的不同比例组合形式
(王荫长、朱荣生，1994)

细肌丝的主要组分是肌动蛋白（actin）。肌动蛋白有两种形式：一种是单个球状分子，称为肌动球蛋白（actomyosin）；另一种是它的聚合形式，呈串珠状，称为纤维状肌动蛋白。细肌丝就是由两条纤维状肌动蛋白相互缠绕形成的。此外还有两种重要的蛋白：①原肌球蛋白，是一种肌丝状蛋白，嵌在肌动蛋白缠绕的凹槽内，每个分子的原肌球蛋白与7个分子的肌动蛋白球结合，能阻止肌动球蛋白横桥的形成。②肌钙蛋白，是一种调节蛋白，在细肌丝上每隔7个肌动蛋白球就有1个分子肌钙蛋白，它能与钙离子结合，改变整个分子的构型，使肌动蛋白能与肌球蛋白形成肌动球蛋白横桥。

细肌丝起始于Z盘，按一定的比例和方式插入该肌节的粗肌丝中。与高等动物不同，昆虫肌肉的粗细肌丝的比例通常为1:3，而且每一细肌丝均位于相邻的两个粗肌丝的中间，在粗肌丝周围形成一个六角形的包围圈。内脏肌中细肌丝的比例可达到1:6，也就是每根粗肌丝的周围圈有12根细肌丝（图1-31）。

### 3.2.3 神经细胞

神经细胞内特征性细胞器为神经原纤维，由大量的微管和微丝组成。昆虫神经细胞主要包括细胞体和轴突两部分。轴突内的细胞器不同于细胞体，特别在周缘神经的轴突内，沿轴突纵向分布的微管、微丝特别丰富，周围还伴随许多神经分泌颗粒和线粒体。

神经胶细胞内微管也较丰富。神经胶细胞也是神经系统的组成部分，神经原需要的营养全由胶细胞供应。神经胶细胞内丰富的微管，能保护它的胞质片层呈螺旋状环绕在轴突外围，使它执行支持、保护和滋养神经的功能。在许多昆虫中，附着在肌肉、背血管、生殖腺和分泌腺体上的神经轴突及其神经胶细胞内微管相当丰富。它们不但作为细胞骨架，

还可能参加细胞内物质代谢，以及运送神经递质到作用部位，使之产生反应。

## 第三节　生殖细胞的发生

昆虫生殖细胞的发生和形成是按一般生物学规律进行的，它受到保幼激素和蜕皮激素的调控。昆虫的种类和数量在生物界都居首位，其原因除了昆虫作为一个类群，具有体躯小、食物范围广、生活周期短和适应性强等有利因素以外，更重要的是昆虫具有强大的生殖能力和特殊的生殖适应性，两性生殖使昆虫种群能保持大量的遗传结合体，保证了昆虫家族的繁荣昌盛。

与其他陆栖动物相同，昆虫还具在缺水环境下生殖的能力。精包授精的方式和卵壳的特殊结构，不但能保证精子进入卵内受精，而且还有良好的通气保水性能，保证了胚胎发育的完成。

生殖系统特有的结构和功能，赋予昆虫生殖细胞具有极强的生命力，它与害虫数量的消长密切相关，因而受到人们的重视。

### 1　精子的发生与形成

昆虫的精子发生（spermatogenesis）是在精巢内以生精囊（spermcyst）为单位进行的。在同一个生精囊中，由于精原细胞进行不完全的胞质分裂，使所有的精母细胞都通过细胞质桥彼此相连。在减数分裂以后，精原细胞继续保持了这种连接方式，细胞质桥可以使细胞内营养物质在细胞之间流通，并且还可借此沟通信息。因此，同一个生精囊内所有精细胞的分裂和发育都是同步进行的，在同时期内能够产生足够的精子，保证精子在相互竞争条件下受精。

#### 1.1　精巢和精巢小管

精巢（testes）通常呈椭圆形或分裂成叶状，借气管和脂肪体固定在消化道的背面或侧面。精巢中的精巢小管（testicular tubes）的数目和形状在不同种类的昆虫中变异很大。有的小管之间是相互分开的，有的则是结合在一起，外周被以围膜。鞘翅目肉食亚目和双翅目只有1根卷成螺旋状的精巢。多数鳞翅目有左右两个精巢，在腹部中央融合成一个整体，每个精巢含4根精巢小管。直翅目蝗科的精巢小管多达100根以上。根据生精囊内生殖细胞在管内发育的情况，长形的小管从顶部向基部分为四个区段：精原区、生长区、成熟区和转化区

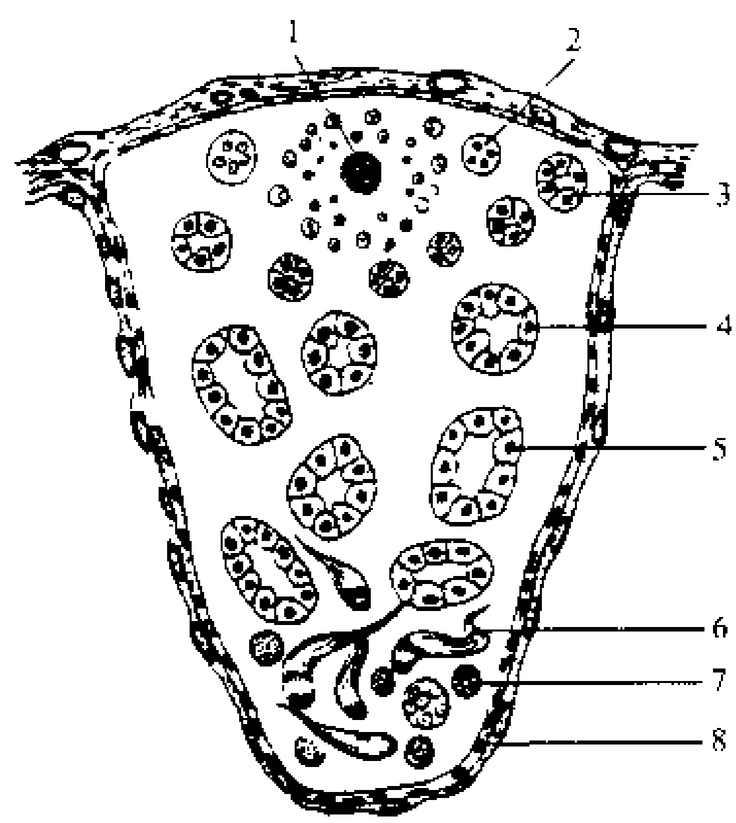



图 1-32　棉铃虫末龄幼虫精巢小管纵切面示生精囊发育过程　1. 端细胞及四周的精原细胞　2. 精原细胞囊　3. 初级精母细胞囊　4. 次级精母细胞囊　5. 精细胞囊　6. 精子束纵切面　7. 精子束横切面　8. 管壁细胞（陈长琨、李国清，1996）

(图 1-32)。但是很多昆虫的精巢小管不是长形的，因此分区并不明显。

### 1.2 精子发生

精子（spermatozoa）由原生殖细胞经过增殖期、生长期和成熟期，最后经过转化期才能形成成熟的精子。

精子发生（spermatogenesis）的初期，在精巢小管顶端有许多干母细胞围绕着一个来源于中胚层的巨大的端细胞（apicalcell）。每个干母细胞通过准二叉分裂，产生一个新的干母细胞和一个精原细胞（spermatogonium），当干母细胞退化时，这种分裂结束，精子发生遂告终止。端细胞能为精原细胞提供营养，两者有胞间连丝相通。在双翅目中，干母细胞还以多胞体形式构成顶端复合体。复合体中的线粒体能转移到精原细胞中，但这种联系不久就告消失。每个精原细胞被来源于中胚层的多个细胞所包围，分别形成独立的生精囊（spermatocyst）。鳞翅目昆虫的生精囊，周围有 8 个囊型细胞（形成生精囊的细胞也可能来自缺乏营养而不能继续发育的精原细胞）。在生长区，生精囊中的精原细胞一般经过 6～8 次分裂，可以产生 64～256 个精母细胞（spermatocyte）。初级精母细胞在生长后期，进行两次连续的成熟分裂，第一次为减数分裂，第二次为等数分裂，结果使每一个双倍体的初级精母细胞，形成 4 个单倍体的精细胞（图 1-33）。

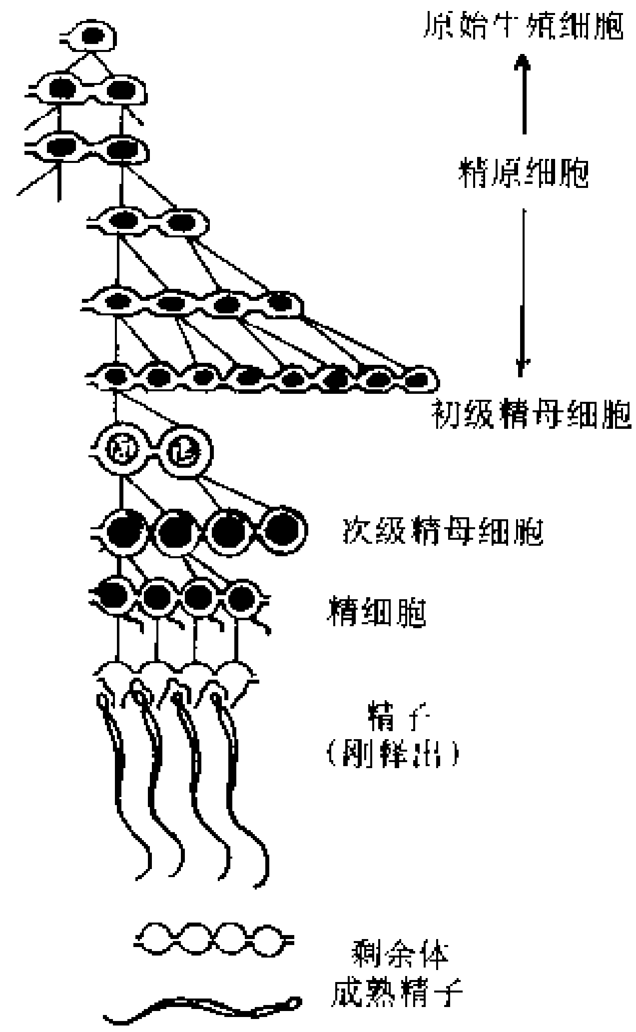



图 1-33 雄性生殖细胞的形成和成熟精子的释放
(Browder，1984)

经两次成熟分裂后，mRNA 依次分配到次级精母细胞和精细胞中，一直要到精子形成前，才具有继续翻译的功能，开始合成特异性蛋白质，促进精细胞向成熟的精子转化。精子发生是由特定的基因控制的。在初级精母细胞期 Y 染色体上有 6 个巨形的袢（loop），类似于卵母细胞灯刷状染色体的侧环，转录 mRNA，翻译成雄性特异性蛋白，如果 Y 染色体上缺少任何一个袢，精细胞发育就会出现异常。

### 1.3 精子的形成

昆虫的精子形成（spermiogenesis）过程包括一系列形态和结构的变化。鳞翅目真核精子在形成过程中，首先是精细胞囊伸长，核向精细胞头部移动，鞭毛部分急剧伸长，然后核也随着伸长，精细胞囊由长棱形发育成纤维状，精子束开始形成。在小地老虎的 5 日龄蛹中，每个精巢中可以见到 5 000 多条真核精子束。成熟的精子束，鞭毛呈波浪形弯曲，长达 360nm，核长 27nm，含有丰富的 DNA。

小地老虎无核精子的形成，明显的不同于真核精子：首先精细胞囊的一端变得较为细长，接着两端同时伸长，微核滞留在中间的膨大部分，以后逐渐缩小，微核中 DNA 也不

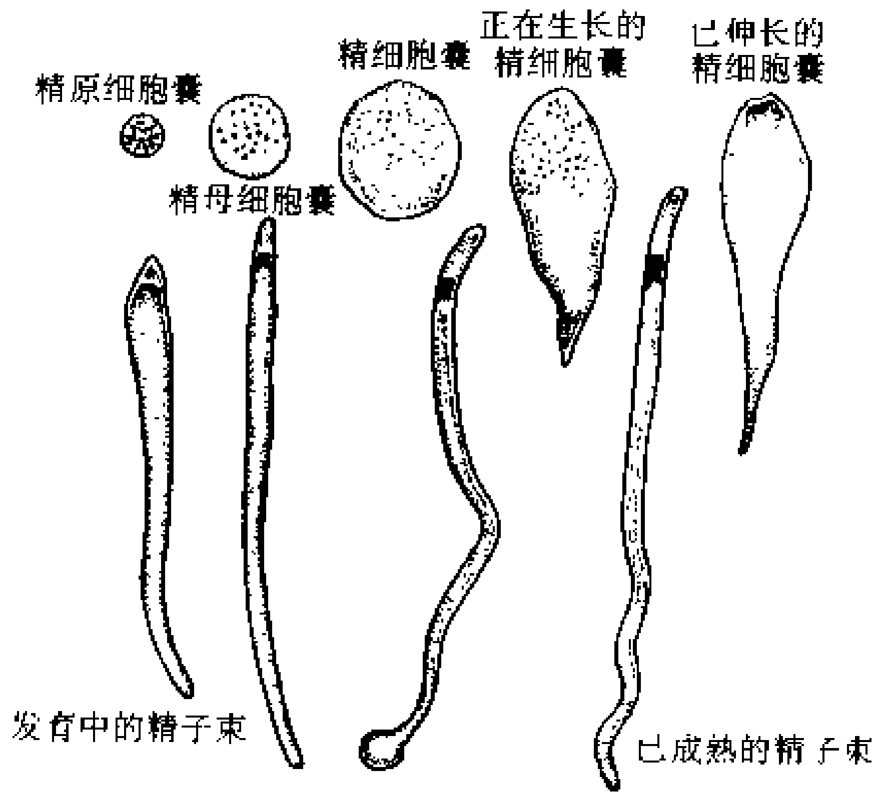



图 1-34 小地老虎精子发生与形成过程
（王荫长、卢中建，1994）

断减少，最后被酶水解。小地老虎每个精巢中有 3 000～7 500 条细长、不弯曲的无核精子束。出现时间，略早于真核精子束。真核精子直到从精包内释放出来的时候，才游离开来，成为分散的精子，而无核精子在受精囊的副囊中，逐渐自溶消失（图 1-34）。

## 1.4 真核精子与无核精子

鳞翅目昆虫的精子具有两型现象：一类是真核精子(eupyrene 或 nucleate)，具有真正的生殖功能；另一类是无核精子(apyrene 或 anucleate)，只有营养功能。在初级的精母细胞期，生精囊既能形成真核精细胞囊，又能形成无核精细胞囊。发生真核精细胞囊的减数分裂过程是正常进行的；而发生无核精细胞囊的减数分裂是异常的。它在分裂中期，染色体不形成赤道板，而保持未配对的状态，或形成多个异态聚合体。这种聚合体在分裂的后期和末期分开，同时形成染色质桥，接着单价的染色体非同步地朝两极移动，随后，染色质桥裂解成染色体片断，并和滞后的染色体一起形成微核，遗留在核膜外，而成为微核结构。

小地老虎、黏虫和棉铃虫等鳞翅目昆虫真核精子发生开始于 6 龄幼虫期，至预蛹后期及蛹初期为发生的最旺盛阶段，同时进入无核精子发生期。在蛹的初期或中期，精巢中具有多种级别的真核和无核生精囊。无核精子的出现受到一种血淋巴因子的诱导，至蛹龄 9d 时，精原细胞囊消失，终止精子发生过程。从一个真核初级精母细胞发育成为一条真核精子束，历时 15d，无核的只有 7.5d。

鳞翅目昆虫真核精子数量极多于无核精子，这对于提高成虫的生殖力是有积极作用。许多学者认为无核精子具有如下的作用：无核精子在雌虫生殖道内为真核精子提供营养；无核精子被丢失的核中的 DNA 被代谢并作为糖原生物合成的原料；帮助真核精子在雌虫生殖道内获得道内的竞争能力；帮助真核精子在雌虫生殖道内转移，为真核精子通过精巢的基膜打通道路；无核精子推迟雌虫的再交配，减少精子竞争的可能性，从而有利于本次交配的真核精子的活力。所以，鳞翅目昆虫产生无核精子是一种十分经济、节约能量和物质的进化结果，大量的无核精子对于真核精子的移动、营养、存活及到最终的受精过程，都起着至关重要的作用。

## 1.5 精子的结构

昆虫精子长约 300nm，直径小于 1nm，体细长。头部长，内有顶体复合体和核。鞭毛极长，它的中心是轴丝，周围有线粒体衍生而成的副器。多数为单鞭毛，也有双鞭毛和多鞭毛的（图 1-35）。

多数昆虫精子的质膜分为内、中、外三层，有的质膜外还附加一层糖蛋白套（glycocalyx）。在蚕目、直翅目和鳞翅目等昆虫中，质膜外有片状外长物。但大多数种类的精子无这种外长物。

昆虫的精子一般都有顶体复合体（acrosomal complex），是由高尔基复合体演变而成的。在有翅亚纲昆虫中，多数种类的顶体复合体内部为稠密结构，周围有糖蛋白层，外层有颗粒状物质。但在其他昆虫中，顶体层次较为简单，有的甚至没有顶体。

精子的核较长，前端呈纺锤形或螺旋形，有的为鞭毛所缠绕，核质致密而均匀，由单倍体 DNA 组成，不含 RNA。核中主要含精氨酸、赖氨酸和组氨酸等组成的精蛋白和组蛋白。

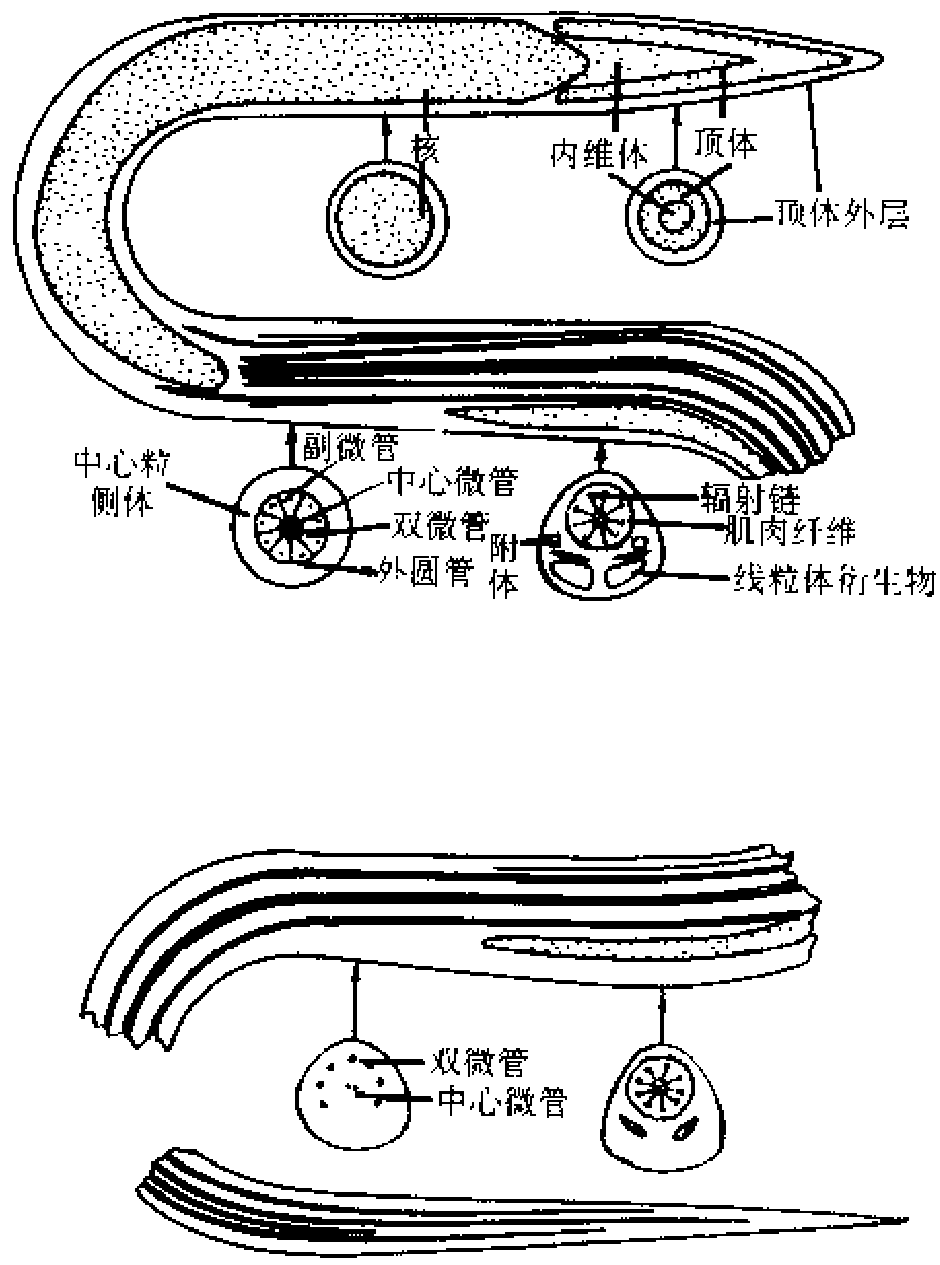



图 1-35 昆虫精子模式图
（Chapman，1982）

昆虫精子的鞭毛由副微管、双微管和中心微管组成，通常呈 9+9+2 的模式。此外，还存在一些连接结构，如双微管伸向中央突起的辐射链（radial links，呈辐射状排列的片层结构）；副微管之间有粗糙纤维（coarse fibres）。鞭毛有 ATP 酶和 UTP 酶活性。在鞭毛的轴丝中，有一个或多个晶体结构的附体，一般认为来源于高尔基体。

线粒体已特化成长形结构，位于鞭毛两侧。它们的细微形态在昆虫种间变化较大。低等昆虫的常态线粒体，基质暗淡，内无晶体物质，内嵴发达，具有明显的细胞色素氧化酶活性。多数线粒体具晶核，短内嵴上有细胞色素氧化酶，而蛋白质基质内不存在与呼吸有关的酶类。竹节虫总科（Phasmoidea）精子中不存在线粒体。

中心粒侧体是一个致密的套鞘，它是积贮碱性蛋白和装配鞭毛轴丝物质的场所，并具有连接头部和尾部的作用。

## 2 卵子的发生与成熟

昆虫卵子发生是在卵巢内进行的。昆虫胚胎的发育早期，分离出原生殖细胞（primordial germ cell）。卵在未受精前，就开始形成预定的生殖细胞的卵质区。这种特化的细胞质，常位于卵的后端，在显微镜下呈现出大而稠密的颗粒状单层。当卵质区被核占据以后，逐渐形成一个由大细胞组成的缓慢进行有丝分裂的细胞群，后来迁移到胚胎内部，最终进入生殖腺中。生殖腺的非生殖性组织，也起源于中胚层，以后形成滤泡细胞。

## 2.1 卵巢与卵巢管

卵巢（ovary）是由孕育卵母细胞的卵巢小管组成的。卵巢管自上而下分为两个区域：生殖区（或原卵区），在此生殖细胞分裂产生卵原细胞，再分化成初级卵母细胞和滋养细胞；生长区，由于卵母细胞数目增多并逐渐长大，形成一系列大小不同的卵室。卵室中央是一个卵母细胞，逐渐发育为成熟的卵，外围为单层的滤泡细胞（follicle cell），在具滋式卵巢管内还有滋养细胞。

卵巢管以滋养细胞的有无和它们在卵巢管内的位置分为无滋式、端滋式和多滋式三类（后两类合称具滋式）。无滋式卵巢管（panoistic ovariole），没有滋养细胞，见于较原始的昆虫中，如无翅亚纲、有翅亚纲的直翅目、蜉蝣目、蜻蜓目和虱目等；端滋式卵巢管（telotrophic ovariole），滋养细胞位于卵巢管的原卵区，以营养索（nutritive cord）与卵母细胞相连，见于半翅目和鞘翅目（多食亚目）昆虫中；多滋式卵巢管（polytrophic ovariole），滋养细胞位于卵室内或卵室外，在卵巢管中与卵母细胞形成交替排列的形式，常见于脉翅目、膜翅目、鳞翅目、双翅目和鞘翅目的肉食亚目中。

## 2.2 卵子发生

卵子发生在卵巢管内进行。在卵子的分裂过程中，由原生殖细胞经过增殖期、生长期与成熟期三个阶段。在增殖期形成卵原细胞（oogonia）；在生长期形成卵母细胞（oocytes）；在成熟期形成卵细胞（ootids）。卵巢管也顺次分为原卵区（germarium）、生长区（growth zone）与成熟区（maturation zone）。

昆虫卵子发生（oogenesis）始期，原生殖细胞经增殖期产生一定数量的卵原细胞，大多经3次分裂，才进入生长期，这时卵母细胞开始沉积卵黄，体积迅速增大，初级卵母细胞经过两次成熟分裂（除半翅目中大多数种类以外，一般第一次分裂为减数分裂），卵细胞开始成熟，逐渐从卵巢管向外排放，但这时卵核并没有成熟，处于第二次成熟分裂的中期，一直要等到精子进入卵母细胞时才完成分裂，形成一个单倍体卵母细胞和3个极体，至此卵细胞才完全成熟，等待受精（图1-36）。

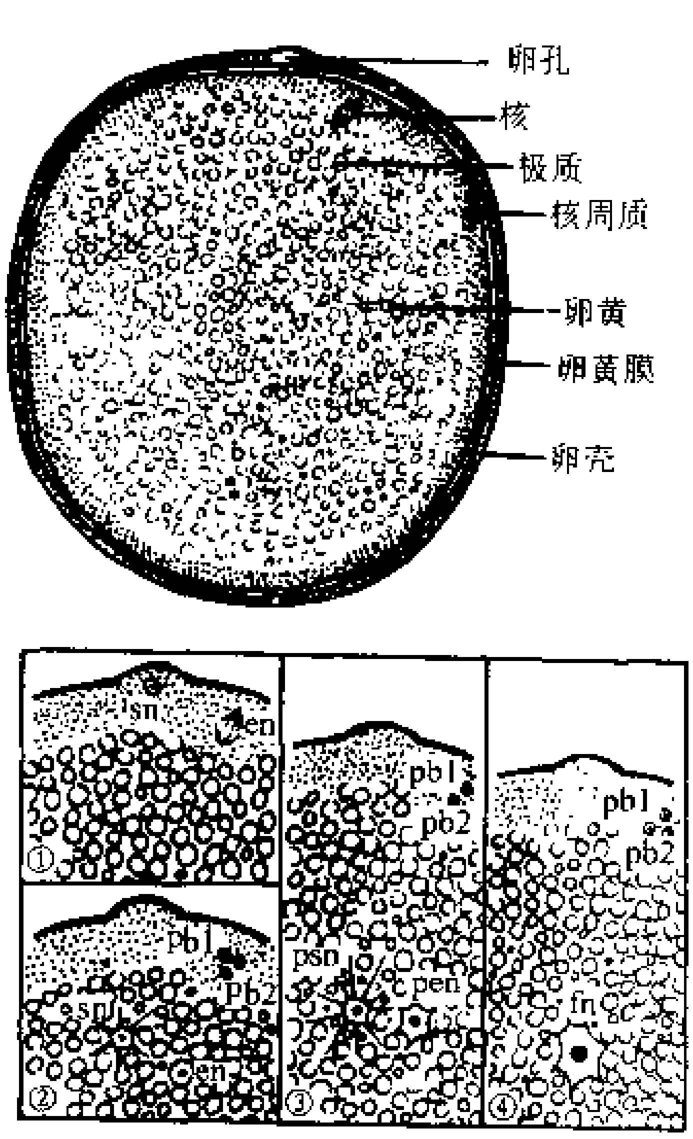



图1-36 家蚕的卵细胞

示卵核的成熟分裂与受精：①产卵当时 ②产后100min ③产后120min ④产后140min en 卵核 fn 第一次分裂核 pb1 第一极体 pb2 第二极体 pen 卵前核 psn 精前核 sn 精核

上图右上方示第二次成熟分裂中期的卵核

（森精，1970）

家蚕胚胎在孵化前生殖腺开始发育，卵孵化以后，雌雄生殖腺发生分化，卵巢管顶部的卵原细胞进行增殖，至3龄幼虫末期，每个细胞经3次分裂，生成8个细胞组成的细胞群，但只有1

个成为卵母细胞（另外 7 个成为滋养细胞）。此后为滤泡细胞所包围，到羽化前 2～3d，卵巢管柄中已充满卵粒。

## 2.3 滋养细胞的产生

滋养细胞（trophocyte）能为卵子发生提供营养，在卵巢管内的产生方式因卵巢管类型不同而异。细胞分化过程也不同，在无滋式卵巢管中，原卵区除生殖细胞以外，只有 1 种前滤泡组织（prefollicular tissue）能产生滤泡细胞，但不形成滋养细胞。

在端滋式卵巢管的原卵区内，卵原细胞进行有丝分裂时，细胞的分裂尚未完成，这时相互之间有细胞间桥（intercellular bridges）相连接，其中一个细胞分化为卵母细胞，其余的分化为滋养细胞。当卵母细胞进入生长区后，滋养细胞有微管骨架固定的营养索（nutritive cord）与卵母细胞相连通。滋养细胞通过营养索为卵母细胞发育提供营养。另外，在卵母细胞外周，还有一层滤泡细胞。

端滋式滋养细胞的分化过程存在种间差异。如长蝽（*Oncopeltus*）的原卵区，滋养组织明显地分为 3 个形态不同的区域：顶部的滋养细胞分裂旺盛，相互之间有细胞间桥相连；中部细胞界限不清，核大且聚集成丛；基部因有丝分裂的结果，细胞较大，中间的细胞质形成滋养髓（trophic core）。在滋养髓内，部分细胞核能合并成大核（giant nucleus），待核破裂后，内含物释放到细胞质中。但是，鞘翅目昆虫滋养细胞在原卵区内，既不分裂，也不形成滋养髓，而形成以胞质间桥连接的合胞体（syncytium）。

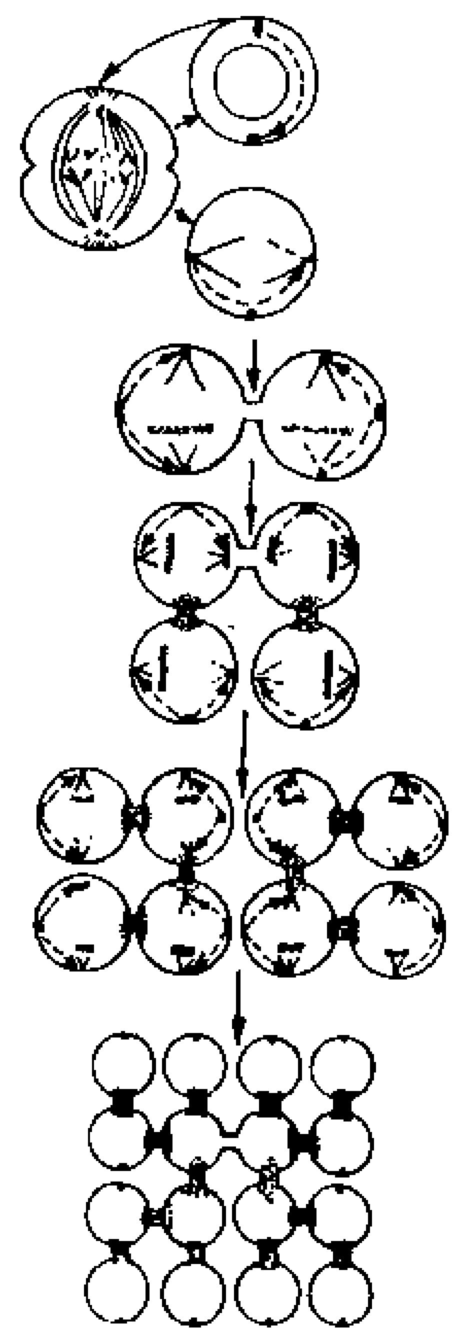



图 1-37 果蝇的卵母细胞和滋养细胞分化图解

示干细胞分裂出 1 个包囊细胞，经 4 次分裂，其中 1 个成为卵母细胞，其余为滋养细胞（Koch，1967）

多滋式卵巢管的滋养细胞和端滋式的相同，也是卵母细胞的姐妹细胞（但双翅目中行幼体生殖的幼虫例外，它们的滋养细胞来自体细胞）。果蝇的卵原细胞占据原卵区的极大部分，1 个卵原细胞的干细胞（oogonia stem cell），通过有丝分裂产生 2 个子细胞，其中 1 个为干细胞，另 1 个成为包囊细胞（cystoblast）。通过 4 次有丝分裂，16 个细胞相互以细胞间桥（或环管）相连，其中 2 个细胞具有 4 个环管，仅有 1 个细胞发育成卵母细胞，其他均发育成滋养细胞（图 1-37）。

## 2.4 滤泡细胞分化

滤泡细胞（follicular cell）包围在卵母细胞和滋养细胞的外周，当卵母细胞和滋养细

胞进入生长区后，滤泡细胞通过有丝分裂增殖，形成由单细胞层构成的卵室围鞘。此后，它们的数量保持不变，但体积不断增加，形状也随之变化，从圆柱体到立方体，最后成为扁平体。它们的功能是为卵母细胞提供营养。在卵黄沉积时，细胞间隙形成通道，使卵母细胞能从血淋巴中吸收到卵黄蛋白和有关的营养物质。此外，还能分泌卵黄膜和卵壳（图 1-38）。

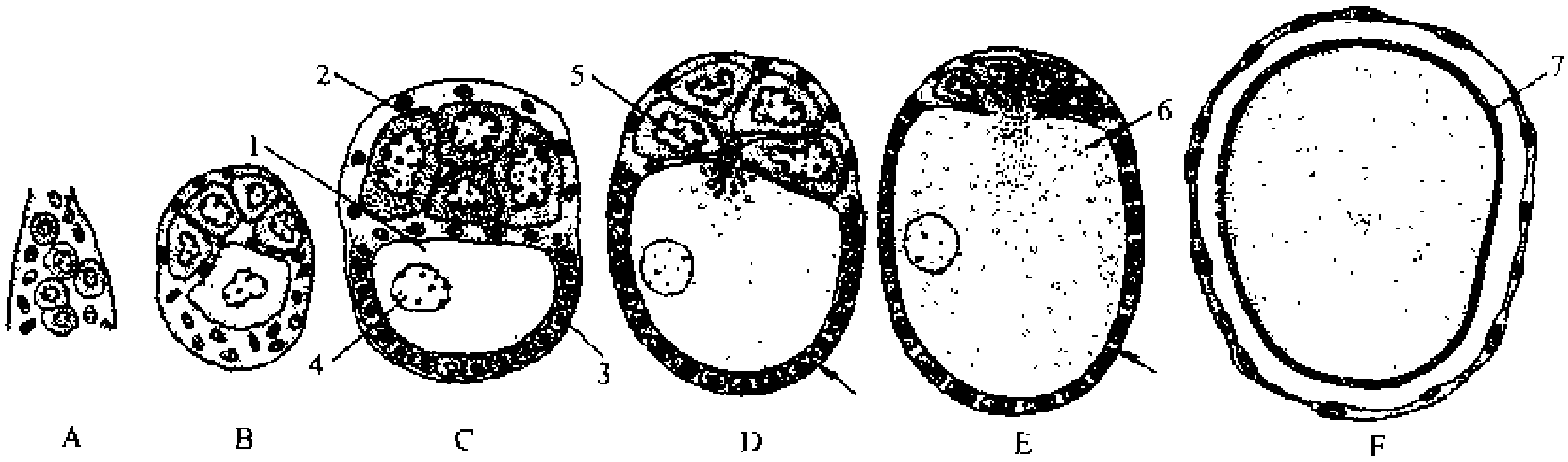



图 1-38 鳞翅目蛾类卵子发生图解

示卵母细胞、滋养细胞和滤泡细胞形态变化 A. 卵室未形成 B. 卵室形成 C. 卵黄沉积前期 D. 卵黄沉积中期 E. 卵黄沉积后期 F. 卵壳形成

1. 卵母细胞 2. 滋养细胞 3. 滤泡细胞 4. 细胞核 5. 营养流 6. 卵黄颗粒 7. 卵壳（箭头示滤泡细胞间隙）

（陈长琨、王荫长，1993）

## 2.5 卵黄发生

当卵母细胞进入生长期以后，即进入卵黄发生（vitellogenesis）阶段，开始沉积卵黄物质，细胞体积迅速增大。卵黄物质按来源可分为两类：一类是由卵母细胞自体合成的内源性卵黄；另一类是由卵母细胞以外的组织和细胞合成的，即异体合成的外源性卵黄。卵黄虽以蛋白质为主，但成分十分丰富。

### 2.5.1 蛋白质

蛋白质是卵黄的主要成分。一般分为卵黄磷蛋白（vitellin）、卵黄原蛋白（vitellogenin）和载脂蛋白（lipophorin）3 种。卵黄磷蛋白是卵的主要营养蛋白，卵黄原蛋白是它的前体，载脂蛋白是沉积卵黄时运输脂类的载体。

卵母细胞、滤泡细胞、滋养细胞和脂肪体细胞都能合成卵黄蛋白。卵母细胞的合成作用，在无滋式卵巢中最为突出，它的灯刷状染色体有较多的 RNA，具有合成蛋白质的能力。滋养细胞还通过自身的解体，向卵母细胞输送卵黄蛋白。

具滋式的卵母细胞核不产生灯刷状染色体，它的功能在卵子发生期是关闭的，而由滋养细胞的核重复提供基因模板，为卵母细胞的生长发育提供 RNA。滋养细胞合成的 RNA，通过一定的通道输入卵母细胞中（图 1-39），卵细胞发育非常迅速，说明滋养细胞的 RNA 合成能力是十分惊人的。例如，果蝇卵子发育只需 8d 时间（无滋式的蟋蟀的卵子发育需要 100d），滋养细胞中 DNA 的含量比卵母细胞的高 1 024 倍。每个卵细胞伴有 15 个滋养细胞，这就相当于几千个染色体的功能组，在短期内就能根据卵母细胞的需要，合成卵黄蛋白。

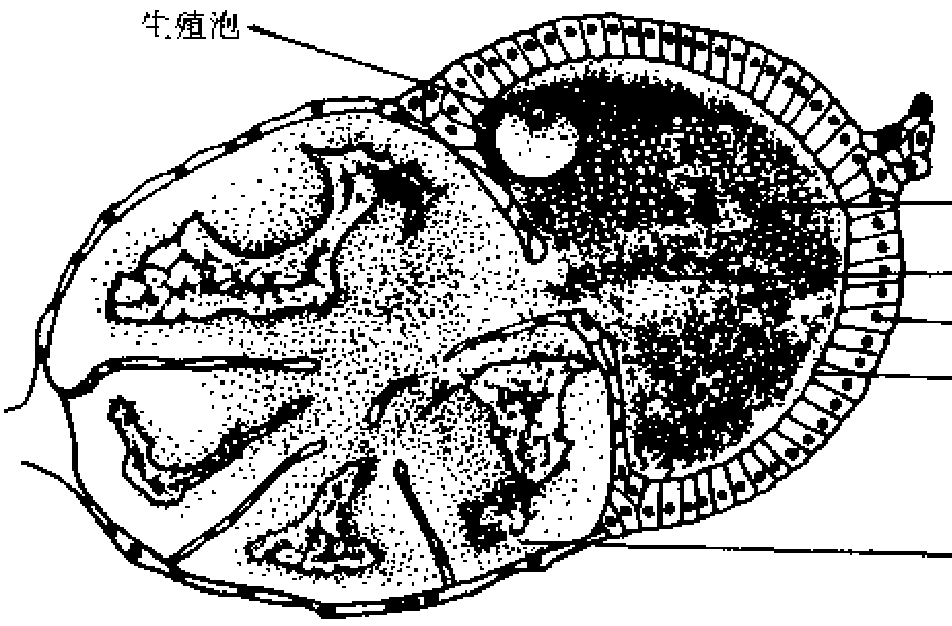



图 1-39 天蚕蛾的卵室
示"营养流"进入卵母细胞
(Berry, 1985)

脂肪体是产生卵黄原蛋白的最主要部位。脂肪体合成的卵黄蛋白占总量的 70%～90%，合成以后释放到血淋巴中，为卵母细胞所吸收。七星瓢虫、果蝇和麻蝇的滤泡细胞，也能合成卵黄原蛋白。七星瓢虫在卵黄发生前就开始合成，在卵黄发生盛期，它的合

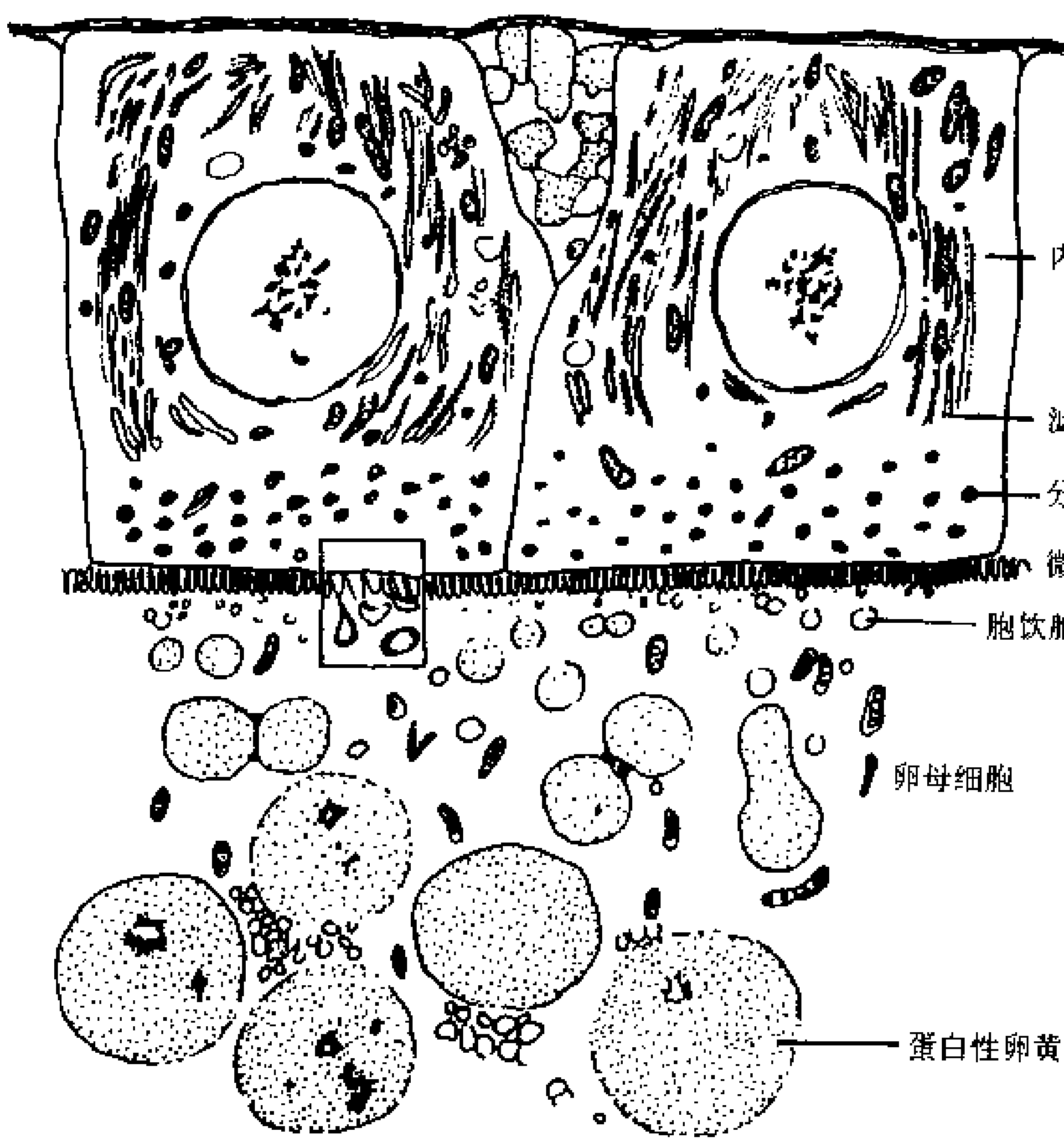



图 1-40 卵母细胞摄取蛋白性卵黄的微胞饮方式
(Loof, 1972)

成量达到脂肪体合成量的20%以上。

卵黄原蛋白是由脂类、碳水化合物、胡萝卜素等多种成分组成的复合蛋白。其脂类主要是中性脂、甾醇和磷脂；糖类主要是甘露糖，并有少量氨基葡萄糖和戊糖。脂肪体在合成卵黄原蛋白时，先合成一个较大的多肽前体，释入血淋巴中，被卵母细胞吸收时，又进行特异性的分解和合成。飞蝗脂肪体合成的卵黄原蛋白前体的分子量（225～235）×$10^3$u，在血淋巴中分解为5个亚基，然后再进一步合成为成熟的卵黄原蛋白。

卵母细胞对卵黄原蛋白的吸取具有高度选择性和种属特异性。它通过微胞饮方式（micropinocytosis）摄取卵黄原蛋白（图1-40）。而卵黄原蛋白本身具有刺激卵黄沉积的能力，促进卵母细胞产生胞饮作用。如惜古比天蚕蛾卵母细胞中的卵黄原蛋白，就有这种刺激作用，致使卵母细胞内卵黄原蛋白的浓度比血淋巴内高20～30倍。通常不同属昆虫的卵黄原蛋白，很难被异种卵母细胞所摄取，而且亲缘关系愈远，相互摄取愈困难。

载脂蛋白能将脂类物质（主要是甘油二酯）转移到卵母细胞内，在卵黄沉积时进行贮存，供早期胚胎发育使用。载脂蛋白在运输脂类时，首先与甘油二酯形成特殊复合物，然后经血淋巴将脂转移到卵巢中（同时能转移到其他组织中）。载脂蛋白在血淋巴中的含量比较稳定，它的氨基酸组成与卵黄原蛋白相似，但糖类含量较低，脂类含量较高。

### 2.5.2 糖类

多数昆虫的卵黄蛋白和卵黄原蛋白都含有糖类，除糖原以外，还有甘露糖、葡萄糖、海藻糖和果糖。它们与蛋白质结合成糖蛋白或糖蛋白复合体，并由此构成糖性卵黄（carbohydrate yolk）。糖原通常是卵母细胞自身合成的。在昆虫卵黄发生早期，糖原合成酶的含量随卵母细胞生长而增多，至卵黄发生末期，大量葡萄糖在酶的作用下迅速转化为糖原。糖原的后期合成是动物界卵子发生的共同特点。在果蝇和海岸肥螋（*Anisolabis maritima*）中，糖原是由滋养细胞合成的，以后才进入卵母细胞内。在长蝽（*Oncopeltus*）和美洲大蠊的卵母细胞内，则没有糖原。

### 2.5.3 脂类

脂类在卵母细胞中形成脂性卵黄（lipid yolk），它们大多来自脂肪体，依靠载脂蛋白通过滤泡细胞间隙，运送到卵母细胞的表面，被卵母细胞胞饮吸收。因此，在某些昆虫中，当脂肪体内含脂量减少时，卵母细胞中含脂量就明显增加。但在具滋式卵巢管中，脂类可能来源于滋养细胞。

在许多昆虫的卵母细胞中，高尔基体参与脂性卵黄的合成。合成时，高尔基囊泡内充满脂质，以后囊泡不断增大，初期出现磷脂小滴，进而形成均匀的甘油三酯，最后成为脂性卵黄体。

## 2.6 卵壳

昆虫的卵壳（chorion）具有多种生理功能。它有适宜的弹性，既有利于排卵和幼虫脱壳，又能保护胚胎免受不良环境的伤害，它的特殊防御机制能阻止病原生物的侵袭和防止水分的损失。

卵壳是一种多层次蛋白质复合体，类似于昆虫的表皮。在卵黄沉积后期，先由滤泡细胞或卵母细胞分泌一层多糖性质的卵黄膜，然后滤泡细胞按一定次序，大量分泌不同性质的蛋白质，其中有100种以上的结构蛋白（蛋白质含量占卵壳的95%以上）。通常把卵壳分为具脊的外卵壳和有结构分化的内卵壳；也有分为内、中、外三层或更多层次的。吸血蝽的卵壳，由内向外分为内多元酚层、抗性蛋白层、外多元酚层、琥珀色层、软蛋白质层、软脂蛋白层和抗性脂蛋白层等7层，各层的组分和结构都有很大的差异。

昆虫卵壳的构型有很多种间差异。家蟋蟀卵壳蛋白结构呈均匀脂滴状和类结晶的鳞片状；天蚕蛾则是纤维丝螺旋排列的片层结构；小地老虎的外卵壳排列成片层，而内卵壳呈多微孔的有序结构。高度复杂的卵壳结构，反映出昆虫在分泌蛋白时是按一定程序连续进行的。例如，多音天蚕蛾（*Antheraea polyphemus*）的卵壳中片层的旋转呈倾斜状，构成5个辐射状部分，先形成网状结构，再往网格中分泌基质，增加片层的致密程度，最后才分泌表层。各种昆虫的卵壳表面都有特异的花饰，有的具六角形网纹，有的有纵棱与横棱。这些结构都是滤泡细胞造成的印记。

卵的前端有卵孔（micropyles），它的下方有受精孔管伸至卵内，这是接纳精子的通道，因此又称精孔。昆虫的卵一般有1个卵孔，但也有多个的。在吸血蝽的卵壳上在200个凹窝内有10～20个真卵孔；飞蝗卵的端部有排成一圈的35～43个卵孔。

卵壳上的气孔（aeropyles）及其附属物，是卵子交换气体的呼吸结构，有利于在胚胎发育时摄取氧气和排除二氧化碳，并能保持卵内水分平衡。这些结构由多孔的网状蛋白组成，间隙中充满着空气。卵所处的生态环境不同气孔结构和数量也不同。柞蚕的气孔位于卵壳上众多的六边形卵纹的顶角处，外周具围壁；红蜡蚧卵孔帽（micropylar cap）边缘上约有180个气孔；稻蝽卵壳上有成圈排列的32个呼吸角；丽蝇卵壳有结构极为复杂的具泡气孔，卵浸在水中时，在卵壳的一定部位形成气盾（plastron），构成水和气相的扩散界面，便于胚胎吸取溶解在水中的氧，并进行气体交换。

## 第四节 细胞变态与成虫器官发育

变态是昆虫胚后发育的最大特点，在动物界中最为复杂。根据胚后发育未成熟虫态与成虫形态的差异程度，可分为多种变态形式：无变态（无翅亚纲昆虫）、半变态（外翅类多数昆虫）和全变态（内翅类昆虫）。

昆虫变态研究的主要对象为全变态昆虫。全变态昆虫成虫与幼虫的形态结构差异较大，生活习性迥然不同。在蛹期幼虫器官的解体，需经过细胞形态和生理生化代谢复杂的系列改变，形成新的成虫细胞，才能重新组建成虫器官，完成基本生命活动。全变态昆虫成虫器官形成的方式，除了多细胞成虫器官芽的发育和单细胞的分裂增殖之外，还有幼虫细胞变态。全变态昆虫细胞变态过程中能动态观察到细胞变态的特殊性和多样性，细胞整体结构和功能的改变，细胞器发生和相互转化的过程，细胞核染色体形态改变和基因表达。

### 1 成虫器官发育

全变态昆虫种类很多，成虫器官形成方式亦较为复杂。昆虫种间或同种昆虫不同器官

间成虫器官形成的方式存在差异。可归纳为3种类型：多细胞器官芽的分化、单细胞的分裂增殖和幼虫细胞的变态。

## 1.1 器官芽分化

成虫器官芽是胚胎时期形成的胚基，为一群未分化的细胞群，在虫体内保持特定位置。在高等双翅目昆虫中，如家蝇幼虫消化道的特定部位，能辨认出唾腺芽、前肠芽、中肠上皮芽、中肠肌芽、后肠芽等器官芽；鳞翅目幼虫位于中、后胸的翅芽（图1-41）。在幼虫期器官芽持续生长，但这些细胞始终保持胚胎型，即核大，胞质少，胞质内粗面内质网等细胞器也少。至蛹期在蜕皮激素作用下，器官芽细胞迅速分裂和生长，直到成虫羽化时成虫器官细胞才完成发育。

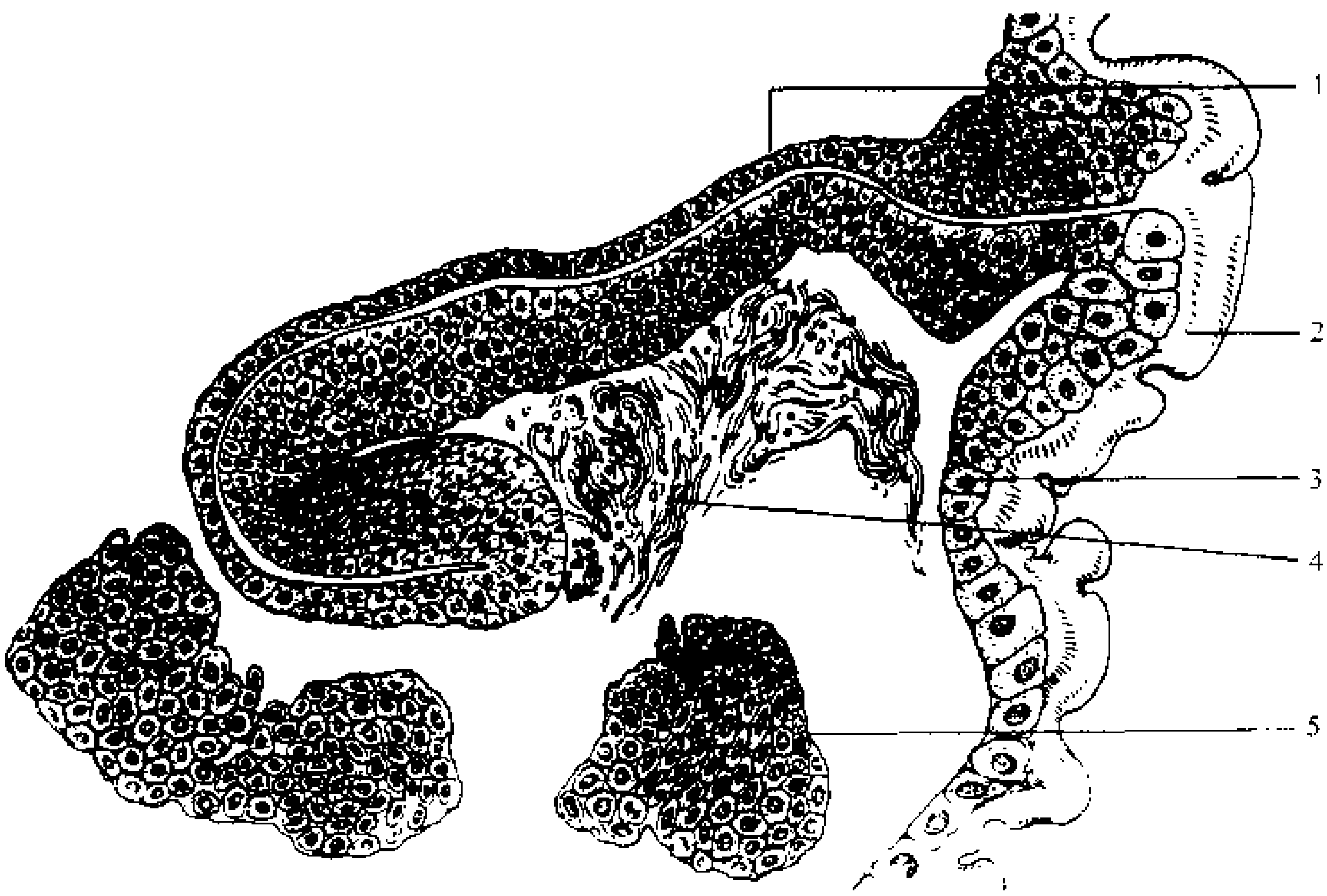



图1-41 鳞翅目幼虫翅器官芽
1. 翅芽 2. 表皮 3. 皮细胞 4. 网状气管束 5. 原血细胞堆
（陈长琨、王荫长，1994）

## 1.2 单细胞分裂

由单细胞分裂构建成虫器官的最好例证为中肠的再生细胞。鳞翅目昆虫中肠的再生细胞，是一种具有分裂能力的小型细胞，细胞核较大，胞质少，胞质内游离核糖体较多。在幼虫停止取食进入预蛹期时，中肠的杯状细胞和柱状细胞崩解，并脱落进入肠腔，再生细胞迅速分裂和分化，构建成虫的中肠细胞（缺少杯状细胞），如小地老虎1d蛹的新中肠细胞就整齐排列在中肠肌肉的内层（图1-42）；家蚕刚分化的中肠细胞顶区微绒毛内有致密

的线粒体，胞质内含有很多液泡，液泡内有钙离子沉积，然后逐渐形成致密颗粒排出胞外。

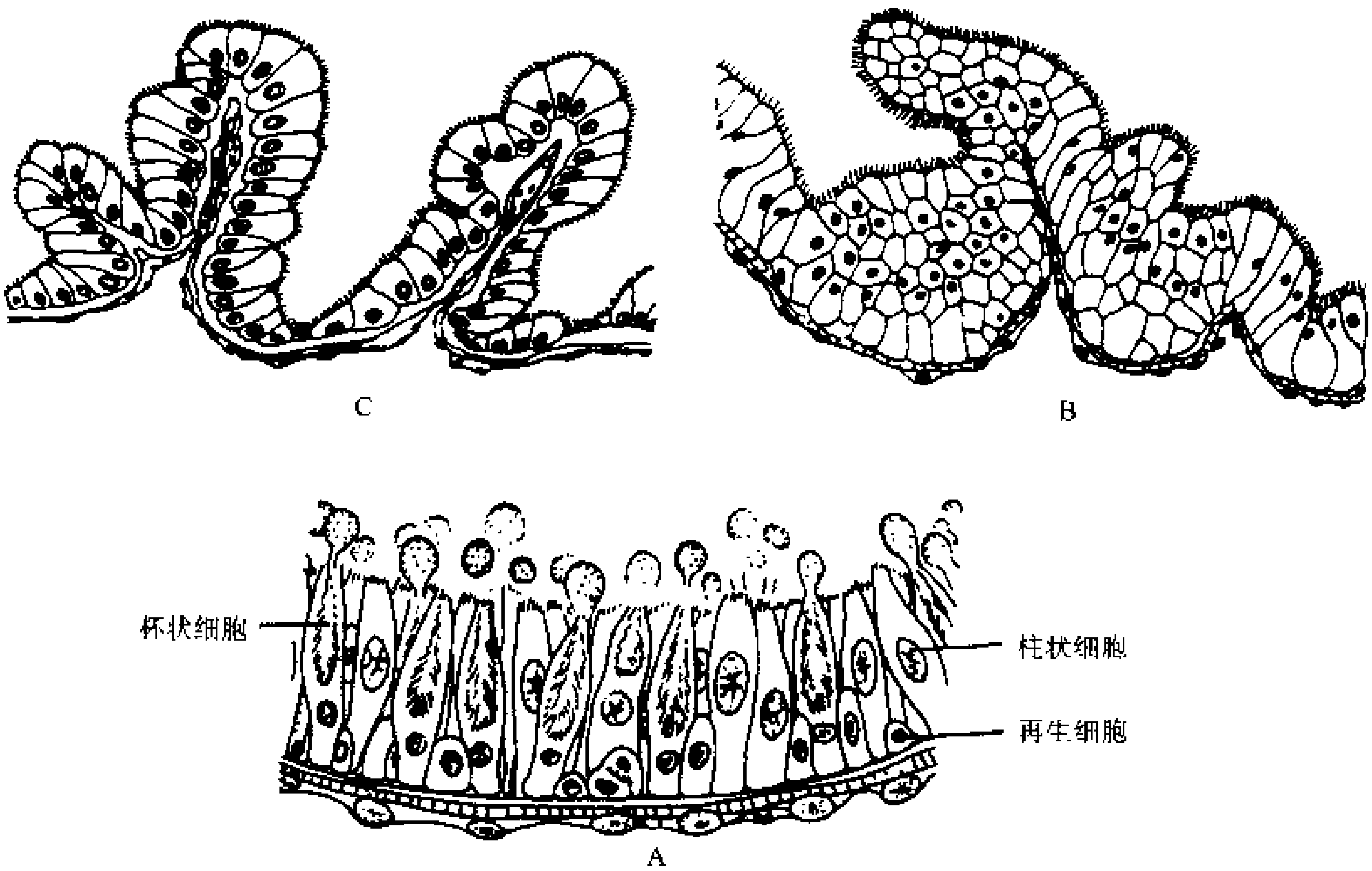



图 1-42 小地老虎中肠再生细胞分化和重组
A. 幼虫 B. 一天蛹，示再生细胞迅速分裂 C. 成虫
（陈长琨、朱梁生，1994）

### 1.3 幼虫细胞变态重组

幼虫细胞变态后重新组建成虫器官的方式，在全变态昆虫中并不少见。成虫器官形成，是由幼虫器官细胞经蛹期改变为成虫细胞，终止了幼虫细胞功能，赋予成虫细胞新的生理功能。如天蚕蛾幼虫下颚的外颚叶的感觉细胞，经蛹期改变为成虫巨大的分泌细胞，分泌的溶菌酶有助于成虫脱茧羽化；柞蚕幼虫的丝腺经蛹期转变为分泌无机盐的腺体，分泌物成为脱茧时碳酸盐缓冲液的成分。鳞翅目昆虫幼虫皮细胞变态重组后，皮细胞分泌表皮功能发生改变，分别分泌柔软的幼虫表皮，坚硬的蛹皮和鳞片丛生的成虫皮。

## 2 细胞变态

细胞变态是指昆虫变态时，幼虫细胞经预蛹和蛹期亚细胞结构和生理功能系列改变后，重新组建成虫细胞的程序。在鳞翅目夜蛾科昆虫小地老虎（*Agrotis ypsilon*）、棉铃虫（*Helicoverpa armigera*）和黏虫（*Mythimna separatia*）中，如成虫的马氏管、直肠、脂

肪体、后肠和前肠细胞，是由幼虫细胞变态后重新组建的。3 种昆虫从幼虫经蛹至成虫的变态过程中，这些器官的发生过程是相同的。幼虫细胞并非死亡，而是有程序的改变，即在仅有细胞核的崩解幼虫细胞残骸内原位重组，而不是幼虫细胞完全破坏后由成虫器官芽或成虫组织细胞重新发生形成的。“细胞变态”观点认为：①“细胞变态”的变态启动在预蛹期，幼虫细胞崩解，其内的粗面内质网、线粒体、微绒毛和基膜内褶皆变为自体吞噬泡，细胞核存在；②成虫细胞分化在蛹期，崩解幼虫细胞内自体吞噬泡逐渐消失，细胞核分化或分裂，成虫细胞的细胞器重新构成；③羽化后，成虫器官细胞便执行与幼虫不同的新的生理功能。本节以鳞翅目小地老虎为例，介绍马氏管、直肠、脂肪体、后肠和前肠的“细胞变态”过程。

## 2.1 马氏管

鳞翅目昆虫幼虫的马氏管经蛹期转变为成虫的变化有两种形式。一种是幼虫马氏管的大部分外形不发生变化，仅隐肾复合体内的端段部分解体，如巢蛾（*Hyponomeuta*）和粉蝶（*Pieris*）幼虫；另一种是幼虫的马氏管全部解体，成虫的马氏管由器官芽重新形成，如谷蛾（*Tineola*）和蜡螟（*Galleria*）幼虫。小地老虎马氏管的变化属前者，成虫的马氏管是由幼虫的发育而成，成虫马氏管的外形与幼虫的相比较，除无隐肾复合体外，仅长度有所缩短，其余无明显区别。

### 2.1.1 幼虫马氏管细胞学特征

小地老虎幼虫的马氏管外观为乳白色细长管，共 6 根，以 3 根为一组，先后经两次并合后，在基段并成左右两根，分别与两根公共管相连接，通入后肠前部。所有马氏管均平行地分布在消化道四周，先向前伸展到中肠前部，再折回向后延伸，前端发生曲折盘旋，端部插入直肠肠壁与围膜之间，形成隐肾管。马氏管从基部开始，可分为膨大的公共管、较短的基段、细长折叠的中段，以及插入隐肾的端段四部分。

公共管的组织结构与后肠相似。最外层为底膜，可伸入细胞顶端，与内膜接近；中间为单层扁平的细胞层，细胞质致密；内层为较厚的内膜。管壁细胞突入到管腔中，管外有多层环肌，收缩时可以并闭管腔，与幽门的结构相似。说明公共管是由后肠向外延伸形成的，与后肠同起源于外胚层（图 1-43）。

基段是连接公共管的分支部分。管腔较粗且短，管壁细胞多突入管腔中。马氏管的横切面可见到 15－20 个细胞核，细胞顶区微绒毛短，排列稀疏，其中有的内含线粒体。说明顶区的运输功能较小，但在微绒毛基部有较多的圆形或椭圆形线粒体。

中段是马氏管中最长的一段。细胞形态分化较大，可以观察到数种类型的细胞，它们之间的微绒毛疏密程度及排泄方式均有很大差异。但前端存在 1 种较小的细胞，基区内褶浅，微绒毛细而短，其中无线粒体，顶区有较小的圆形液泡排入管腔。中段管壁细胞排泄原尿的主要特征，是具有多种胞吐方式，排出的物质与细胞质无明显差别，这与其幼虫有较强的代谢能力有关，最后转变为结晶颗粒。

端段处于围肾膜下，在膜外可见到弯曲盘旋的管子。管壁细胞的形态与中段的相似，亦有多种胞吐现象。

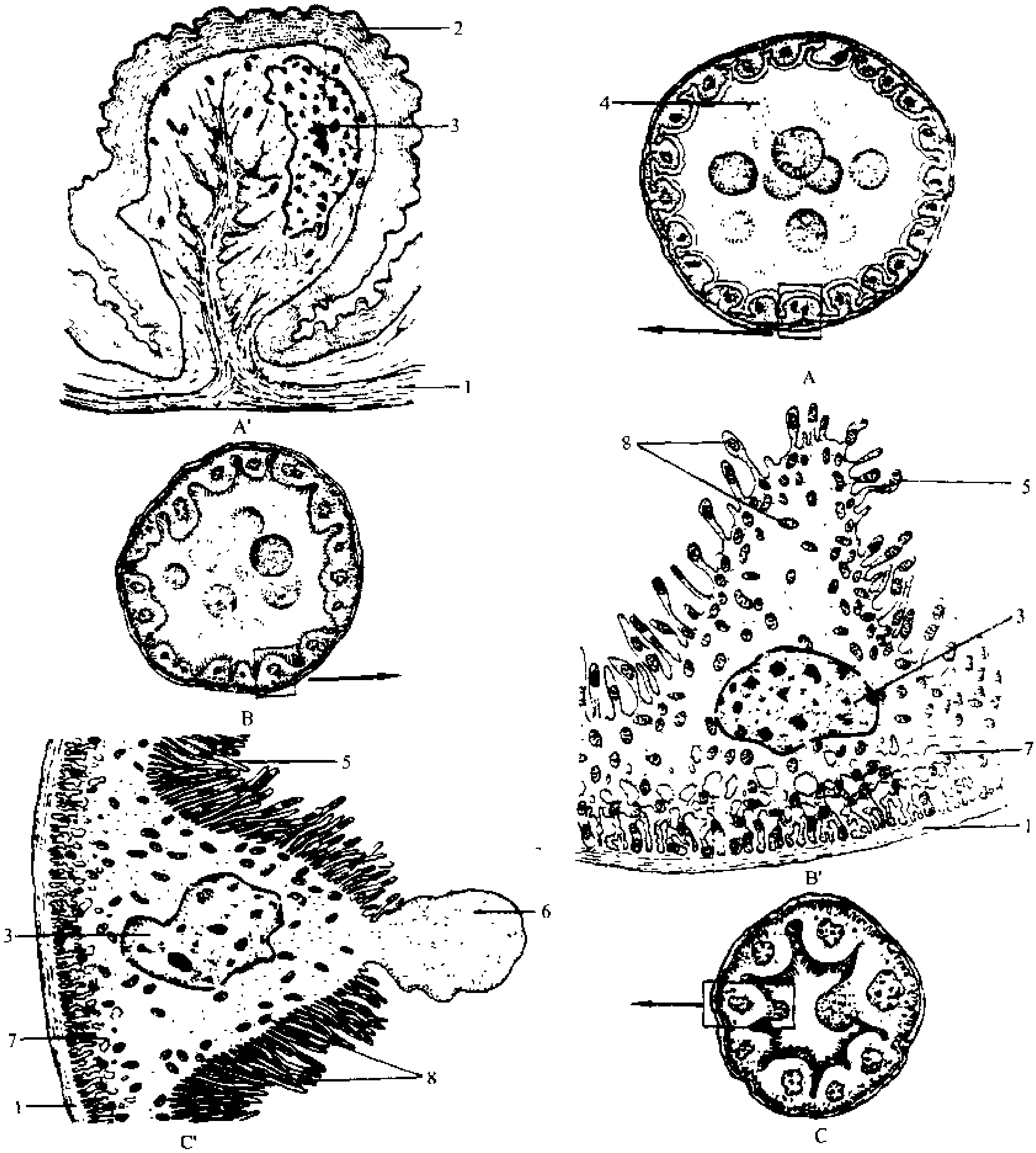



图 1-43 小地老虎幼虫马氏管细胞横切面

A. 公共管 B. 基段 C. 中段 A'、B'、C'. 管壁细胞

1. 围膜 2. 内膜 3. 细胞核 4. 排泄颗粒 5. 微绒毛 6. 排泄囊 7. 基膜内褶 8. 线粒体

(陈长琨、朱荣生，1991)

### 2.1.2 细胞变态过程中亚细胞结构变化

幼虫和成虫的马氏管分泌细胞虽有相似的运输细胞结构，但在细胞变态过程中亚细胞结构发生显著变化。幼虫细胞顶区有致密微绒毛，内含椭圆形线粒体，基区有发达的基膜内

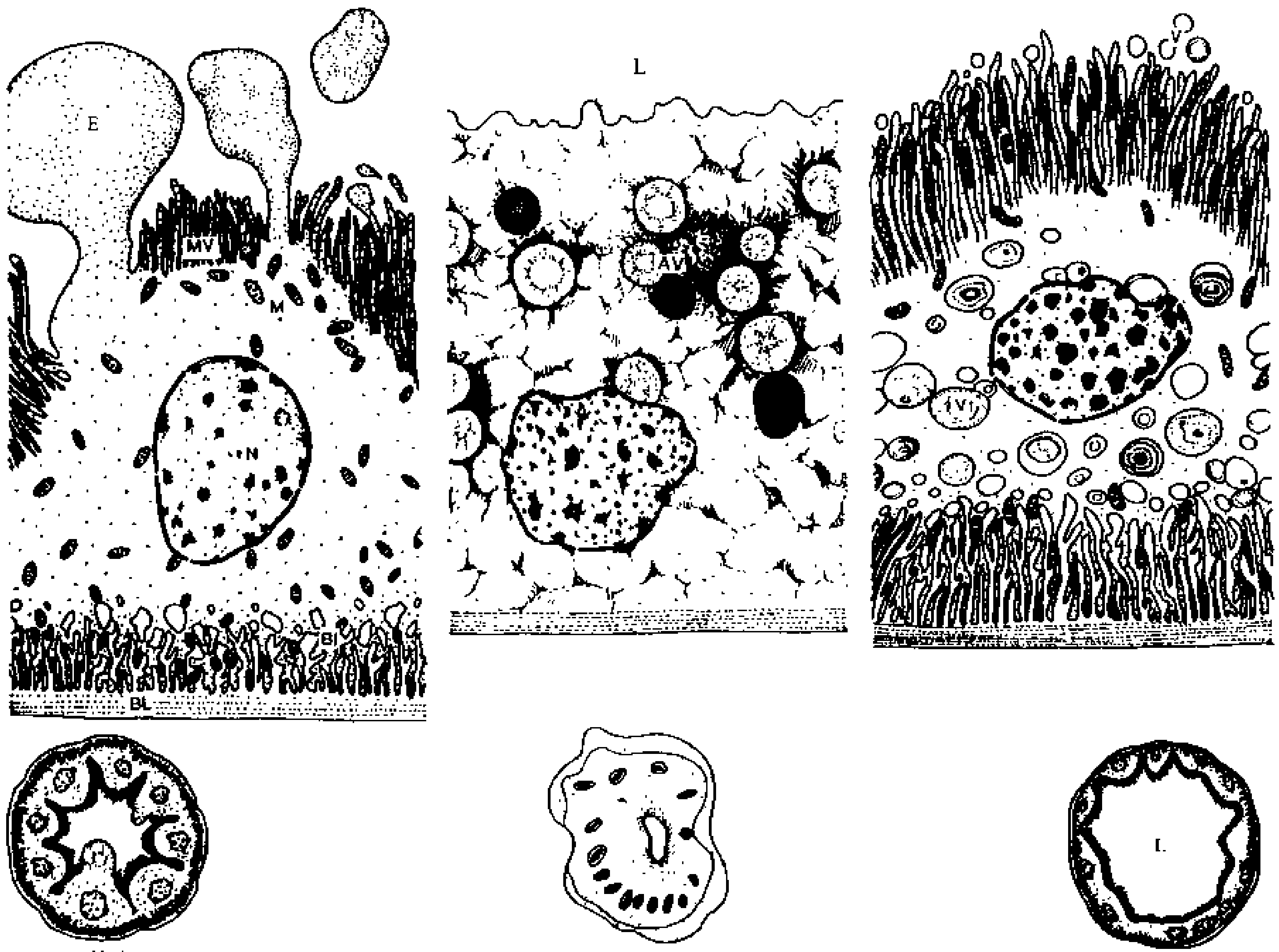



图1-44 小地老虎马氏管“细胞变态”图解

上列三图示细胞结构 下列三图示马氏管横切面

AV. 自体吞噬泡 BL. 底膜 E. 分泌囊 L. 腔 N. 核 V. 液泡

(陈长琨、王荫长,1996)

褶；预蛹期幼虫马氏管细胞解体，线粒体、微绒毛和基膜内褶等细胞器消失，形成自体存噬泡，细胞核仍存在；成虫马氏管细胞在蛹期由解体的幼虫细胞原位重组，微绒毛、线粒体和基膜内褶重新分化后形成。幼虫和成虫的马氏管细胞，皆为典型的运输细胞，具有对水分、离子和小分子化合物进行细胞内外运输能力。幼虫马氏管细胞排泄原尿主要有 3 种胞吐形式：微绒毛顶部胞吐、微绒毛间胞吐和顶膜胞吐。成虫马氏管以液泡排放方式为主。

成虫马氏管细胞顶区微绒毛致密，内具棒状线粒体，基区基膜内褶发达，中区有大小不等的液泡，泡内有多种内含物，核位于细胞中区的上方与顶区的微绒毛相接近。成虫细胞结构与幼虫的主要区别在于具有复杂的液泡系，多种多样的液泡是在幼虫细胞器解体后预蛹时开始出现的，进入蛹期不断增多，为幼虫细胞变态过程中最显著的结构变化特点（图 1-44）。

## 2.2　直肠

小地老虎成虫直肠发生的过程，细胞变态程序与马氏管的基本相同，由幼虫的直肠细胞经预蛹期结构解体和蛹期重组与功能性分化。但也存在不同之处：一方面幼虫细胞在重组时，经过细胞迅速分裂阶段；另一方面成虫直肠功能比幼虫的复杂，所以幼、成虫细胞结构差异较大。

### 2.2.1　幼虫直肠的细胞结构

小地老虎幼虫的直肠和马氏管形成隐肾复合体，自内向外包括：内膜、肠壁细胞、底膜、内列马氏管、内层膜、外列马氏管、外层膜、环肌、纵肌、围膜等层次（图 1-45）。直肠细胞为典型的运输细胞结构。细胞基膜内褶较深，少量线粒体分散于基区细胞质中；顶端外突成致密微绒毛，密集的线粒体位于微绒毛基部或伸入其内。反映出直肠细胞顶膜

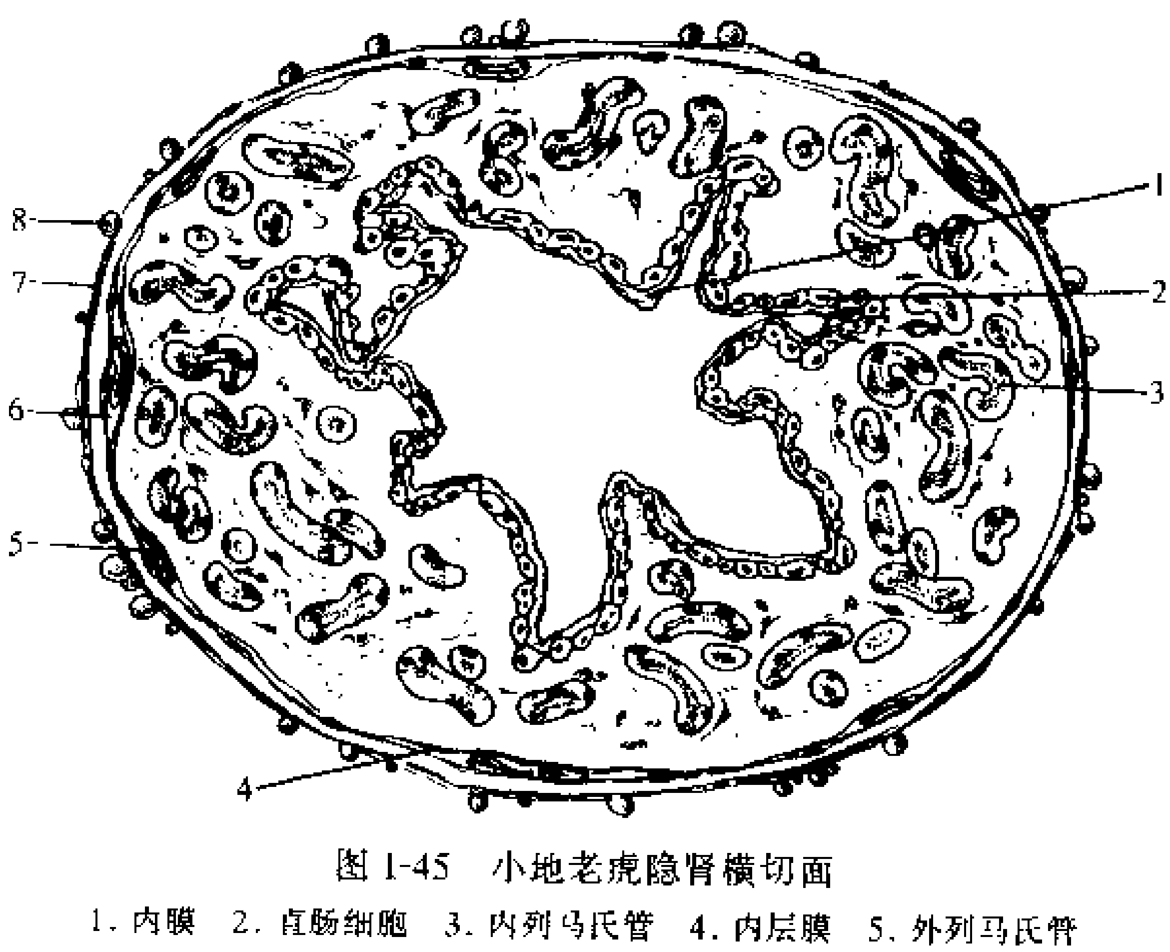



图 1-45　小地老虎隐肾横切面

1. 内膜　2. 直肠细胞　3. 内列马氏管　4. 内层膜　5. 外列马氏管
6. 外层膜　7. 环肌　8. 纵肌
（陈长琨、杜中杰，1996）

主动运输功能大于基膜。

### 2.2.2 成虫直肠形态发生和细胞结构变化

变态期，直肠的解剖形态发生显著变化。在成虫直肠形态发生过程中，预蛹期幼虫的隐肾解体，体积极度收缩；化蛹后 1～5d，在隐肾原位逐渐膨大成囊状直肠，色泽由乳白变为透明，直肠囊前端逐渐突出成囊顶，乳突已清晰可见；蛹后期（5～14d）囊状直肠及乳突形态不再发生变化，仅在体积上略有增加。

变态期直肠细胞结构变化极为显著。预蛹期幼虫直肠细胞解体，细胞核呈正异固缩强嗜碱性，细胞质的电子密度加深，微绒毛、基膜内褶和线粒体等亚细胞器发生退变、形成自体吞噬泡。蛹初期（化蛹后 1～5d）直肠细胞剧烈分化，预蛹期隐肾解体后，原幼虫的直肠细胞在化蛹后 36～60h 迅速分裂，形成细胞堆，细胞核质比极大，细胞核强嗜碱性。至化蛹后 5d，由于分裂的细胞迅速分化，在膨大的囊状直肠横剖面上，已显示出扁平的直肠上皮细胞和圆盘状多层细胞的乳突。蛹后期（化蛹 5～14d），直肠上皮细胞及乳突细胞的结构基本形成。成虫的直肠细胞是扁平的，无运输细胞的典型结构。直肠乳突由 4 种特化细胞构成。

### 2.2.3 乳突细胞的功能性分化

小地老虎成虫直肠乳突不均匀分布在囊状直肠上，除囊顶和凹槽内缺少外，其余部分均有分布。直肠乳突呈圆盘形，乳突细胞按结构和功能分为 4 种（图 1-46）：帽状细胞，每个乳突中有 1 个大型帽状的细胞，细胞直径为 60～65$\mu$m，细胞高度为 12～17$\mu$m，核为念珠环状，细胞顶膜具指状突起，紧贴直肠内膜，胞内充满微管和线粒体，有时可见到中部有一横向的沟状内隙，基膜中心与微气管细胞相接，基膜四周与盘底细胞相接；微气管细胞，来源于腹部第七节气门的气管分支近乳突盘底中心处，再形成更细的分支，穿过乳突的盘底细胞，集结于帽状细胞与网状细胞之间圆锥形中心腔内，腔底直径和高度为19～24$\mu$m；网状细胞，在微气管细胞与盘底细胞间，铺盖成一单细胞层，细胞顶膜无指状突起，胞质内充满空隙而构成网络，少量线粒体分散其中，细胞核基位；盘底细胞，位于乳突底部的一层小型细胞和网状细胞紧密接合，支托着帽状细胞和微气管细胞，细胞基膜内褶深达细胞直径的 1/2 以上，线粒体多分布于基膜内褶之内，细胞核顶位。

小地老虎成虫直肠的功能性结构是直肠乳突。乳突体积扩增能导致直肠膨大。膨大直肠的乳突盘底直径比皱缩时能扩大约 1.3 倍，随之乳突体积扩增约 2.2 倍。直肠乳突有一套完整而精细的细胞结构，能扩增乳突的体积和供应足够的氧气和营养。帽状细胞是乳突体积扩增的功能性细胞。在帽状细胞内充满了弯曲的微管和许多大型线粒体。微管是细胞的骨架，在获得能量时它变形而促使细胞体积扩大，同时保持细胞呈帽状。数量较多的线粒体能为运动提供足够的能量。微气管细胞纠集于乳突的中心腔内，当帽状细胞体积向外扩大时，锥形腔的体积也随之扩大，微气管内气压减少，直肠外支气管内的气体进入乳突，促使乳突体积进一步扩增，又保证供应帽状细胞能量代谢所需的大量氧气。网状细胞的胞内空隙可能有利于乳突的形状变化，特别是扩增体积。盘底细胞发达的基膜内褶及线粒体能在乳突和血淋巴之间进行物质运输。

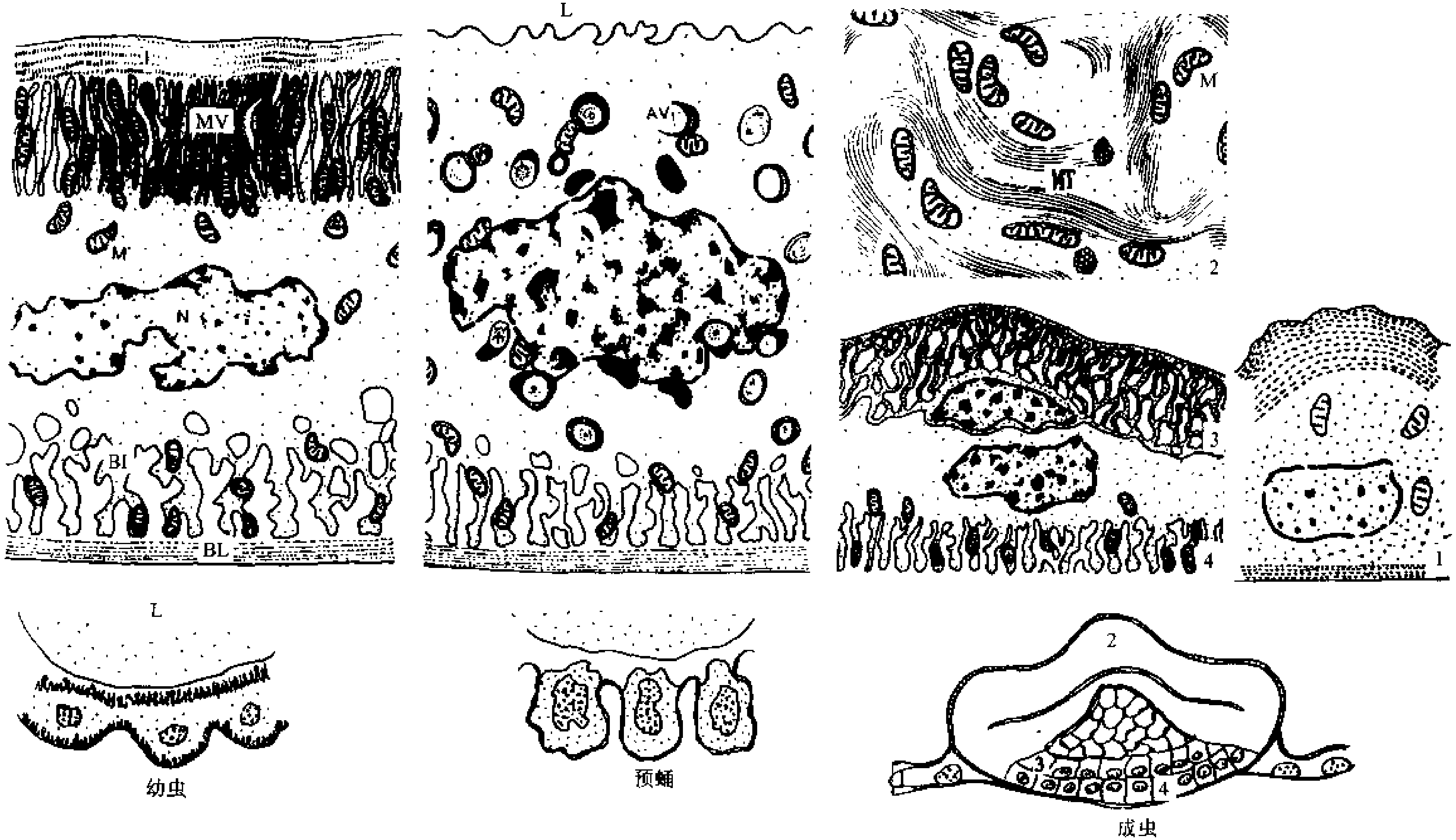



图 1-46 小地老虎直肠"细胞变态"图解

上列三图示细胞结构 下列二图示直肠横切面(局部)

1. 直肠细胞 2. 乳突的帽状细胞 3. 乳突的网状细胞 4. 乳突的盘底细胞

AV. 自体吞噬泡 BL. 底膜 M. 线粒体 N. 核 MV. 微绒毛 BI. 基膜内褶 MT. 微管

(陈长琨、王荫长, 1996)

鳞翅目昆虫成虫直肠的功能主要是对水分和无机盐的吸收，还具有参与呼吸代谢和分泌信息等多种其他生理功能。小地老虎成虫在羽化、飞翔、交配、授精和产卵等一系列生理活动中，皱缩扁平的直肠膨大成囊状。膨大的直肠能增加飞行昆虫的浮力。成虫羽化时膨大的直肠挤压腹部末端，使血液向前运行，增加头部血压，有利虫体出壳和展翅。在成虫生殖活动中有利释放性信息素、雄虫精包形成和雌虫产卵等。

## 2.3 脂肪体

脂肪体是昆虫生长发育和变态期糖类、蛋白质、脂类等化合物生物合成和代谢转化、激素和外源物质包括进入虫体的化学药剂进行降解和解毒的一个重要器官。在鳞翅目昆虫中成虫脂肪体细胞发生有 2 种类型：1 种是幼虫脂肪体细胞自溶，成虫脂肪体重新由前体细胞形成，如小桕天蚕（*Samia cynthia ricini*）；另 1 种由幼虫脂肪体细胞重组为成虫细胞，如惜古比天蚕蛾（*Hylophora cecropia*）。小地老虎成虫脂肪体细胞发生属后者。

### 2.3.1 细胞结构的变化

幼虫脂肪体分布于整个血腔，但主要集中在腹部，以消化道附近较多。细胞为柱状，紧密排列呈条带状，核圆形或椭圆形，核分裂在后期幼虫，细胞内出现双核或多核，核染色浅，异染色质少，核具明显的双层膜结构。胞质内丰富的粗面内质网，排列呈片层状，因受到脂肪滴的挤压，以致形成很多扁平的池槽。胞质内线粒体和游离核糖体也较多；细胞外被以结缔组织围膜。

预蛹期带状脂肪体集聚成团，核伸长呈正异固缩。胞质内充满蛋白质颗粒，有的来源于由粗面内质网和线粒体等细胞器解体形成的自体吞噬泡，有的是细胞从血淋巴中吸取的蛋白质组成。

蛹初期脂肪体围膜破裂，细胞原位解离成游离的单个细胞，核膜不清晰，核小体分散在细胞质中，随着蛹龄增加，游离的幼虫脂肪体细胞，以气管为中心集聚重组，形成“成虫脂肪体”雏形，围膜重现，但胞质内仍充满蛋白质颗粒。

成虫脂肪体细胞以气管为中心集聚成圆球状，横切面呈花朵形，核圆形，核膜清晰，着色浅，胞质内重新出现粗面内质网、线粒体和较大的脂滴，蛋白质颗粒大部分消失（图 1-47）。

### 2.3.2 细胞功能的改变

脂肪体“细胞变态”过程中，从幼虫经蛹至成虫随结构重组，细胞功能产生明显改变。就蛋白质代谢能力来说，6 龄幼虫在 1～5d 期间，每克脂肪体的蛋白质含量稳定在 7.1～8.4mg 之间，随后逐步升高，至预蛹期达 16.3mg 的峰值。蛹初期，雄蛹和雌蛹的含量分别增高到预蛹期的 1.63 和 2.4 倍，但在蛹龄 2～8d 内迅速下降到 6 龄幼虫期的水平。至蛹龄 9～13d（包括预成虫），含量又突然猛增，雌蛹尤为显著。脂肪体和血淋巴蛋白质含量的变动说明，脂肪体细胞幼虫期和成虫期以合成代谢为主，脂肪体和血淋巴蛋白质含量出现 2 个峰值；预蛹期以贮存代谢为主，有较强的从血淋巴中吸收和胞质内贮存蛋白质的能力，使血淋巴蛋白质含量下降，胞质内蛋白质颗粒出现；蛹期则以转化代谢为

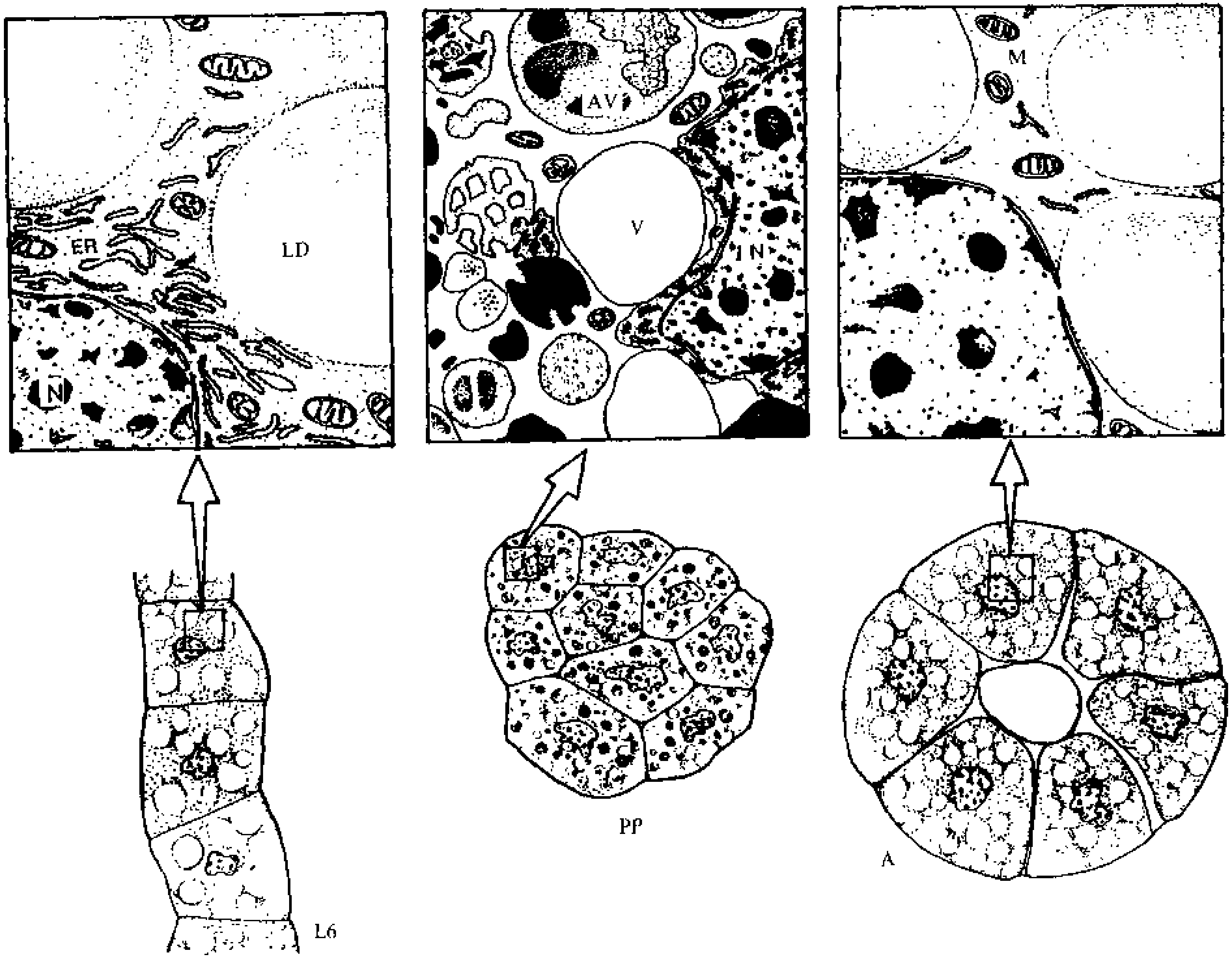



图 1-47 小地老虎脂肪体“细胞变态”图解

LD. 脂滴 AV. 自体吞噬泡 V. 液泡 L6. 六龄幼虫 PP. 预蛹 A. 成虫

（陈长琨、王荫长，1996）

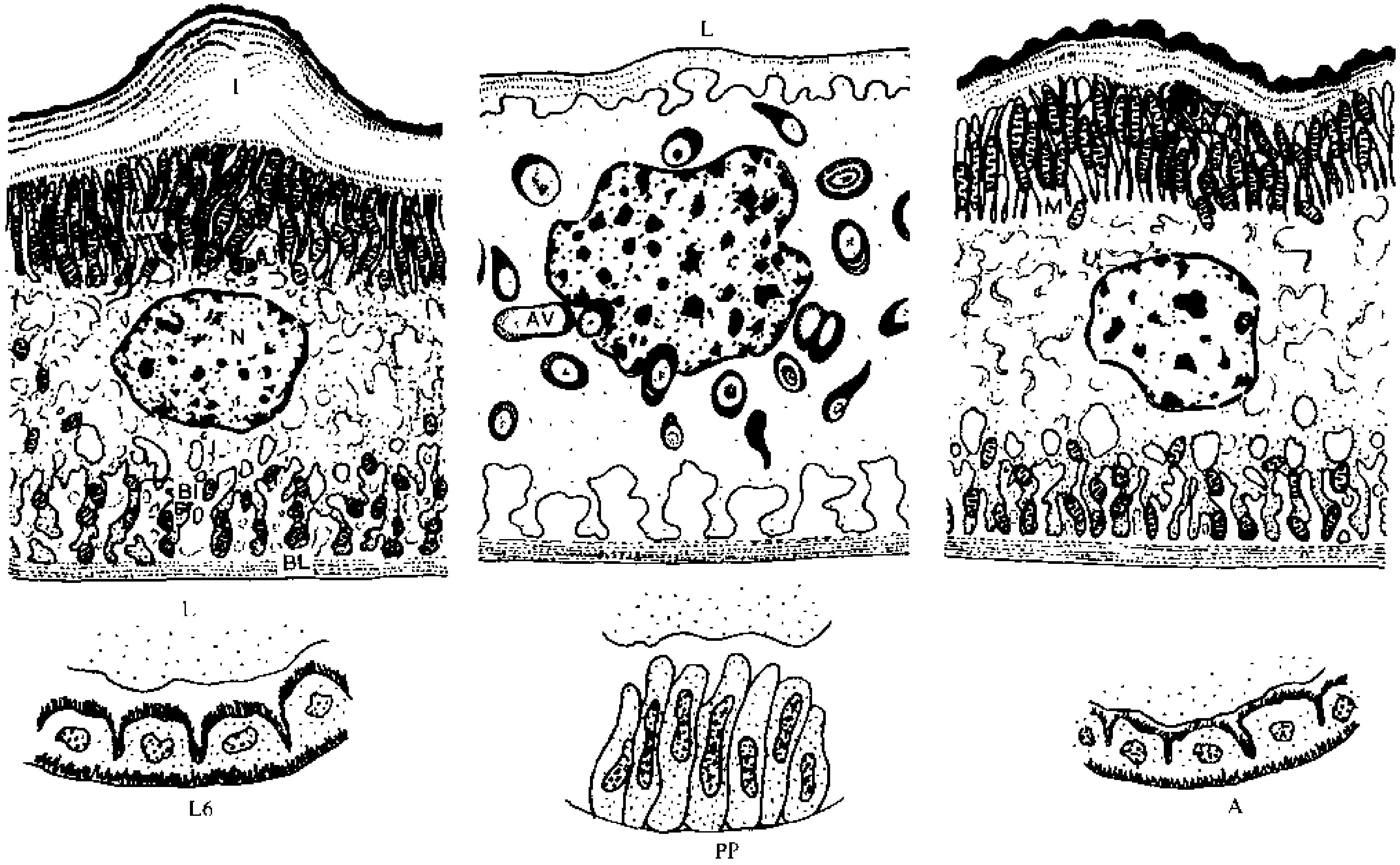



图 1-48 小地老虎前后肠"细胞变态"图解

上列：图示细胞结构 下列：图示前后肠横切面(局部)

I. 内膜 L. 腔 AV. 自体吞噬泡 L6. 六龄幼虫 PP. 预蛹 A. 成虫

(陈长琨、王荫长,1996)

上，胞质内蛋白质颗粒一方面转化为成虫细胞的结构蛋白，另一方面为其他器官发生提供蛋白来源。

预蛹期脂肪体细胞内的多种形态的蛋白质颗粒，表现出细胞极强的蛋白质贮存能力。预蛹期的细胞核明显伸长，染色质凝聚成很多小团，核膜的双层结构模糊；粗面内质网、线粒体及核糖核蛋白体显著减少，而出现多种类型的蛋白质颗粒。根据蛋白质颗粒的组分和形成过程，可归纳为下列4种主要类型：①由多个衰退的线粒体合并形成的颗粒。功能线粒体一般呈椭圆形，内具细而密的嵴，而衰退的线粒体电子密度高，内嵴变得模糊不清，随后，由多个衰退线粒体进行合并，形成蛋白质颗粒。在这类颗粒中，有时还可观察到残余线粒体的外形和内嵴。②由内质网集聚形成的颗粒。首先由正常的内质网聚集成小团，然后内质网局部膨大成囊状，电子密度增高，随后内质网小团大部分都出现膨大并进一步凝聚。③由游离膜包围糖原和蛋白质微粒形成的糖蛋白颗粒。开始时，游离膜分别包围糖原和蛋白质微粒，然后两者再合并成糖蛋白颗粒，围膜上并可吸附一些蛋白质微粒。④由游离膜包围线粒体，粗面内质网及糖原形成的混合颗粒。蛹后期当“成虫脂肪体”雏形出现时，细胞内蛋白质颗粒仍很多，占细胞横切面1/2以上，成虫羽化后蛋白质颗粒极少存在，表明脂肪体有极活跃的蛋白质转化功能，蛋白质颗粒代谢转化后，为成虫结构发育和性器官分化所用。

## 2.4　前后肠

幼虫前后肠（回肠与结肠）“细胞变态”程序与马氏管、直肠和脂肪体的基本相同。小地老虎幼虫和成虫的后肠具有典型的运输细胞结构。幼虫细胞顶端具有致密的微绒毛，内含线粒体，其上覆盖一层表皮质内膜，细胞基部有基膜内褶，分布少量线粒体；预蛹期细胞的微绒毛和基膜内褶多数消失，线粒体显著减少，自体吞噬泡形成，核呈正异固缩；前蛹期（1～5d）幼虫的细胞核迅速分裂，以致蛹后肠长度从1d的2.2mm增加到5d的14.8mm，增长了6.7倍，为成虫后肠长度的89.7%（成虫为16.5mm）；至蛹5d，成虫前后肠细胞雏形出现，其细胞结构与幼虫的相似，仅细胞间隙明显增加（图1-48）。

前肠细胞变态的过程与前后肠相同。但幼虫和成虫的细胞结构与前后肠不同：细胞扁平，无明显的微绒毛和基膜内褶，线粒体亦少。

# 第三章 昆虫的中间代谢

经过半世纪的研究，已经证实昆虫体内与其他生物有相似的中间代谢和三羧酸循环，许多结论已进入传统的教材，为让读者对此有一个系统全面的了解，20 世纪 80 年代中期英国伯明翰大学教授 Candy 和美国依利诺斯大学 Friedman 教授在这方面进行了详细的综述，本章内容主要引自他们的综述。

为叙述方便，本章中许多生化术语，采用缩写形式缩写符号及其含意如下：

AMP——磷酸腺苷
cAMP——环腺苷酸
ADP——二磷酸腺苷
ATP——三磷酸腺苷
GTP——三磷酸鸟苷
UDP——二磷酸尿苷
UTP——三磷酸尿苷
PPi——无机焦磷酸
Pi——无机磷酸
NAD——烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（辅酶Ⅰ）
NADH——还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（还原型辅酶Ⅰ）
NADP——烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（辅酶Ⅱ）
HADPH——还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（还原型辅酶Ⅱ）
FMN——黄素单核苷酸
FP——黄素蛋白
FAD——黄素单腺嘌呤二核苷酸
aa——氨基酸
CoA——辅酶 A

# 第一节 昆虫的组织与代谢

生物体内主要代谢途径的研究工作，早期多以脊椎动物和微生物做为实验材料。例如，三羧酸循环最早是由 Krebs 和 Johnson 于 1937 年在研究切碎的鸽子肉的制备物时提出来的。而对昆虫的主要代谢途径的研究却起步很晚。在 20 世纪 40 年代后期和 50 年代初才开始。当时并没有确认昆虫代谢在各方面都类似于脊椎动物。于此同时，Albaum 和 Kletzkin（1948）、Calaby（1951）认为有必要证实来自昆虫和脊椎动物的 ATP 结构是相同的。直到 1958 年在维也纳召开第四次国际生化会议时，举行了一次完整的昆虫生化讨论会。会议主席在他的总结中指出："如果人们通过直接检测或间接方式，对广泛研究的 3～4 种昆虫进行归纳，可以发现昆虫具有 Embdem-Meyerhof 糖循环、磷酸己糖途径和 Krebs 三羧酸循环的所有酶类"。后来，Gilmour（1961）也推出了类似的结论。昆虫各种代谢途径及其代谢部位见表 2-1。

**表 2-1 昆虫的主要代谢途径**

| 途 径 | 组 织 |
|---|---|
| 糖酵解 | 肌肉、脂肪体、神经等 |
| 磷酸甘油酯循环 | 肌肉 |
| 三羧酸循环 | 大部分组织中 |
| 脂肪酸 β-氧化 | 肌肉、脂肪体 |
| 脂肪酸合成 | 脂肪体 |
| 氨基酸代谢 | 脂肪体、马氏管、肌肉、中肠 |
| 磷酸戊糖途径 | 脂肪体 |
| 核苷酸代谢 | 脂肪体 |

我们对昆虫代谢能力的大部分知识来源于对少数昆虫种类的研究，主要有蝗虫、蜚蠊、丽蝇、舌蝇、果蝇、蜜蜂和家蚕。它们仅代表已知昆虫种类的 10 万分之一。即使对某一特殊的代谢途径有些证据，但这些证据常常是不够严密的，它们只能证明最终产物的一些关键酶及中间代谢物的存在。例如，由碳水化合物产生乳酸可做为糖酵解的一个证据。

昆虫和脊椎动物间生化相似性的其他证据来自对营养的研究。例如，许多昆虫对 10 种"必需氨基酸"的要求与鼠类相同，对许多维生素的要求与脊椎动物的相同。也许昆虫与脊椎动物最重要的区别在于：昆虫对类甾醇的需求必须从食物中获得，反映了昆虫没有能力形成甾醇环，而哺乳动物则具有合成能力；另一不同点是：昆虫对 $V_D$ 的需求量很小，因为昆虫没有真正的骨骼系统，而脊椎动物在骨骼钙化过程中需要 $V_D$。

尽管昆虫的代谢与其他生物有机体的代谢有类似之处，但它也具有许多独特性。一些代谢（如海藻糖的形成和利用）如"正常"代谢路线上的一个附加反应；而另外一些代谢（如飞行肌中的超高氧化能力）则具有显著的差异。这些特征都是昆虫对不同生理条件的适应。

## 1 昆虫的代谢特点

昆虫对不同环境和生活方式的进化适应，已导致其在形态和生理生化水平上产生很多

特性，有的是某目昆虫所特有的，而有的仅代表个别种类或种群的特征。昆虫特化的实例及其代谢的意义见表 2-2。

**表 2-2 昆虫生理特征的代谢意义**

| 特征 | 生化意义 | 种类 |
|---|---|---|
| 蜕皮 | 蛋白质、几丁质合成及分解的交替进行；暂时停止取食；激素调控 | 所有昆虫 |
| 变态 | 大部分组织分解、重组 | 全变态昆虫 |
| 飞行 | 肌肉中基质的快速氧化；从贮存场所运输基质；激素调控 | 大部分昆虫 |
| 营养特化 | 特异食物（如木材、羽毛、毛发、蜂蜡）的消化、代谢平衡 | 白蚁、蜡螟幼虫等 |
| 抗寒能力 | 合成多元醇（甘油、山梨醇）做为防冻剂或过冷却剂 | 蚕卵等 |
| 提高体温 | 糖酵解中基质循环；肌肉活动 | 熊蜂及多数飞行昆虫 |
| 丝合成 | 快速合成特异蛋白 | 家蚕幼虫 |

像其他节肢动物一样，昆虫在生长发育过程中存在一系列的蜕皮现象。在蜕皮时，外表皮分解，其他组织停止生长发育。更进一步的特化发生在全变态的昆虫中，在变态期间，几乎所有的组织都要重新改组。这些都明显地显示了组织的代谢，因而在不同的生长发育阶段，在降解及合成途径上存在很大的变化，这些变化都受昆虫内分泌系统的控制。

昆虫的另一种生理特化就是飞行活动。飞行的能力对昆虫进化的成功有巨大的贡献，这里再一次表现出昆虫的生化适应性。例如飞行期间高能量的产生，肌肉活动增加代谢的速率及飞行过程中激素的调控。

## 2 组织和细胞的特化

昆虫细胞的分化在不同组织中变化很大，每个组织凭借复杂的细胞组合完成各种功能。组织内高度的细胞分化达到了令人不可思议的程度。例如体壁的皮细胞层就是高度特化的组织，该组织合成外骨骼的各种组分。另外在特化组织中，细胞代谢能力还随着不同的发育阶段而改变。

各种组织的功能及代谢意义见表 2-3。

**表 2-3 昆虫组织的特化和代谢功能**

| 组织 | 功能 | 代谢能力 |
|---|---|---|
| 飞行肌 | 飞行 | 通过对脂肪、碳水化合物及氨基酸的彻底氧化，促使 ATP 的快速合成 |
| 腿肌 | 步行 | 通过无氧糖酵解、ATP 的快速合成 |
| 脂肪体 | 体内代谢平衡 | 消化产物的代谢；血淋巴蛋白、脂肪及碳水化合物的合成；排泄；脂肪和碳水化合物的贮存 |
| 表皮细胞 | 表皮的合成和分解 | 几丁质、表皮蛋白、蜡质的合成等；几丁质酶和蛋白酶的分泌 |
| 马氏管 | 排泄 | 离子及代谢物的主动运输 |
| 消化道 | 消化 | 食物的水解、吸收及某些代谢；排泄；水分再吸收 |
| 神经系统 | 生理行为调控 | 神经递质及激素的合成 |
| 丝腺 | 丝的合成 | 特异的蛋白质快速合成 |

进一步的功能特化发生在单一组织中，例如体壁中不同区域的皮细胞，分别合成表皮、节间膜、气管、前肠和中肠的内膜。又如在脂肪体内，某些区域可部分特化以贮存糖原或进行尿酸的合成；不同类型的细胞比例还随虫体部位的不同而变化；不同类型的肌肉也有不同的代谢能力（表 2-3）。

## 第二节 肠壁细胞的代谢功能

昆虫的肠壁具有双重功能。它是一种物理性屏障，能机械地限制高分子化合物从肠腔向血腔运动；同时，它也是一个代谢组织。根据后一种功能，它分泌酶进入肠腔，将复杂的食物变成简单化合物，然后被肠壁细胞中的酶催化或者直接通过肠壁细胞进入血腔。多糖、蛋白质、大分子的脂类和其他食物都不进入血腔作为营养，除非肠壁细胞膜上存在专一性的水解酶、酯酶或葡萄糖激酶。碳水化合物在肠腔内由多糖变成单糖，然后通过扩散进入血腔，这种情况在一些昆虫中可依靠其他组织的吸收作用，减低血液中单糖含量，从而促进它向血腔扩散。

氨基酸的运转比较复杂，因为许多昆虫的血液内氨基酸浓度很高。蛋白质绝大部分在肠腔内就分解为氨基酸，至少在沙蝗（*Schiotocerca gregaria*）和蜚蠊（*Periplaneca americana*）中是这样。它借助水通过肠壁进行正向扩散（浓度梯度下）；在蝇类（例如家蝇 *Musca domestica* 幼虫）中，也像在哺乳动物中一样，存在着 r-氨酰转移酶循环。

通过对脂类运转的研究，证明了肠壁细胞中合成酶的重要性。复杂的化合物在肠腔中被水解为游离脂肪酸及甘油或者甘油单酯（这些化合物在中肠细胞内还能重新结合成为甘油二酯）。结果，游离脂肪酸、甘油及甘油二酯到达血腔中，其中甘油二酯与专一载体蛋白结合，便被运到贮存部位。

## 第三节 脂肪体内的代谢活动

脂肪体与大分子的合成、营养物以及其他通过肠壁的化合物的代谢有关。脂肪体在一些内翅类昆虫的老熟幼虫中占体重的 40%～60%，并且在某种程度上起到了哺乳动物肝的作用。它含有主要的解毒酶，负责重要代谢物的贮存和释放。由于它具有上述各种功能，所以脂肪体是协调体内所有的重要功能和作出反应的主要组织。例如脂类的吸收和合成以及甘油三酯的贮存，全都发生在昆虫脂肪体中。在激素的影响下，脂肪体中的脂类可以转变为甘油二酯，并在释放到肌肉中为飞行肌提供能量。

脂肪体的组成因昆虫的种类及发育阶段的不同而异。一般由 2 种或 3 种细胞组成。主要是滋养细胞，专门用于代谢活动，尿盐细胞与尿酸的贮存有关。含菌细胞是共生微生物的贮存所，在某些昆虫中起到协调、平衡代谢的作用。

脂肪体多呈松散状结构，不规则地分布于虫体内，甚至包围着脑。脂肪体对器官的紧密包围，使贮存在其中的化合物能很快从代谢源运到消耗部位。在“开放式”循环系统中，脂肪体在一定时间内能决定血淋巴的循环速度。脂肪体在不同的部位以不同形态出现。在不同时间和不同性别间也有差异。在一些内翅类昆虫中脂肪体从幼虫到成虫期都存在。果蝇和其他高级双翅目昆虫脂肪体在变态时经过组织解体后重新构成。

通常将代谢分成两个功能类群：一类主要与降解有关（降解代谢）；另一类主要与合成有关（合成代谢）。当今这种代谢途径的划分已不如以往流行，因为许多代谢途径都是多功能的，降解代谢常常为合成代谢提供基质。例如，食物中碳水化合物到贮藏脂肪的转

化涉及到糖酵解、丙酮酸到乙酰 CoA 的转化，然后是脂肪酸和三酰甘油酯的合成。在细胞中所有相关的反应都可以进入 1 种有效的、单一的三羧酸循环途径。在肌肉中，它的主要功能是提供 ATP（1 个纯的降解代谢功能）。在脂肪体中，其功能主要是为各种合成反应提供基质。因此，一个代谢途径功能的平衡主要随昆虫的种类、组织、营养状况以及昆虫经常遇到的生理压力而变化。

## 1 降解代谢

在昆虫中，最重要的降解代谢途径及功能归纳在表 2-4 中。糖酵解、脂肪酸 β-氧化、三羧酸循环和氨基酸氧化都是为合成 ATP 服务的，然后 ATP 被用于合成反应，为机械运动，维持离子、基质的跨膜梯度提供能量。这些不同的能量代谢途径间的比例平衡依赖于一系列的因素。比如基质的可得性、激素的调节以及生理状况，而且不同的基质能用在不同方式的 ATP 合成中。碳水化合物通过无氧糖酵解生成乳酸，能在缺氧条件下，用作 ATP 的合成。为了能量的需求（如迁飞或变态），脂肪体作为大量基质的贮存场所，也是非常重要和有用的。

表 2-4 降解代谢及其功能

| 途径 | 能量代谢 | 用于合成反应 | |
|---|---|---|---|
| | | 产物 | 辅酶 |
| 糖酵解 | 碳水化合物氧化的第一阶段，能在无氧时使用 | 丙酮酸（乙酰 CoA）、磷酸甘油酯，磷酸丙糖 | ATP |
| β-氧化 | 脂肪酸氧化的第一步，每单位重量的基质产生大量的 ATP | 乙酰 CoA | ATP |
| 氨基酸氧化 | 过量饮食的氨基酸降解；某些鞘翅目昆虫及舌蝇中脯氨酸的氧化 | 糖异生的基质、乙酰 CoA | ATP |
| 三羧酸循环 | 其他代谢途径的产物的最后氧化 | 中间代谢物糖异生、氨基酸合成的基质 | ATP (NAPH) |
| 磷酸戊糖途径 | 无 | 为核苷酸、核酸提供戊糖 | NADPH |

在能量代谢中，所有代谢途径的另外一个功能是提供基质，这些基质能被用作合成反应的起始物质。事实上，磷酸戊糖氧化途径的主要功能是为合成反应提供基质和 NADPH，因此在一些昆虫中这些降解代谢途径，亦有能量代谢的功能。

## 2 碳水化合物的合成

碳水化合物作为营养在昆虫的肠腔中多以葡萄糖或者其他形式的单糖从肠壁进入血淋巴，这些单糖是由多糖通过肠壁上酶裂解后形成的。糖除了直接被代谢组织利用以外，都被运送到脂肪体。大部分昆虫将糖转变为海藻糖（循环运转形式）和糖原（组织贮藏形式），它们之间通过一般的中间代谢相联系，在需要时可以相互转化，并可成为葡萄糖的来源。

在昆虫中，一些基本的生物合成途径归纳在表 2-5 中。

**表 2-5 昆虫体内的生物合成反应**

| 途 径 | 基 质 | 所需辅酶 | 备 注 |
| --- | --- | --- | --- |
| 糖异生 | 通过苹果酸产生氨基酸、甘油、乳酸 | ATP<br>NADH | 在饥饿时非常重要 |
| 糖苷合成 | 通过二磷酸核苷酸糖产生单糖 | ATP、UTP<br>UTP-糖 | 主要用海藻糖、几丁质及糖原 |
| 脂肪酸的合成 | 由柠檬酸形成的乙酰 CoA | ATP<br>NADPH | 过量食物产品的贮存 |
| 氨基酸的合成 | 三羧酸循环的中间代谢物 | ATP<br>(± NADH) | 非必需氨基酸 |
| 蛋白质的合成 | 氨基酸 | ATP、GTP | |
| 嘌呤、嘧啶的合成 | 氨基酸<br>磷酸核糖 | ATP, $NAD^+$<br>NADPH | 核苷酸辅酶、DNA、RNA、尿酸 |

已经发现α，α-海藻糖（trehalose）是1种非还原性二糖，即α-D-呋喃葡糖-α-D葡呋喃葡糖苷。

在大多数种类的昆虫中，血液内海藻糖的含量很高（20～170mmol），所以称为“昆虫的血糖”，但在一些种类的某个发育阶段（例如伏蝇 *Phormia regina* 的早期幼虫）并不存在海藻糖。革翅目中也不存在海藻糖，而以葡萄糖作为碳水化合物的循环源。

海藻糖的浓度尽管在不同虫种中有变化，但在任何一个给定的发育阶段，是相对稳定的，并且受到激素的调节。海藻糖在组织中含量很少，它作为碳水化合物的1种转移形式，从贮存部位通过血液运到作用部位。从这一功能出发，海藻糖比葡萄糖至少有两个优点。

（1）它的分子量是葡萄糖的2倍，所以扩散通过肠壁细胞的速率较低，在正常的情况下其损失可以忽略不计。

（2）作为1种双糖，相对于在血液中每单位的葡萄糖中的渗透压较低。当组织需糖时，它通过海藻糖酶被水解成葡萄糖。

海藻糖的主要合成部分是脂肪体，在其他组织内也发现有合成酶，如在一些昆虫的肠道和肌肉中可以合成少量的海藻糖。在许多昆虫中，它的合成已有详尽研究，葡萄糖通过中肠肠壁进入血液，运送到脂肪体，通过下列的需能反应合成海藻糖：

1）2 葡萄糖 + 2ATP ⟶ 6-磷酸葡萄糖 + 2ADP （己糖激酶）

2）6 P-葡萄糖 ⟶ 1-P-葡萄糖 （磷酸葡萄糖酶）

3）1-P-葡萄糖 + UTP ⟶ UDP-葡萄糖 + PPi （UDP-葡萄糖焦磷酸化酶）

4）UDP-葡萄糖 + 6-P-葡萄糖 ⟶ UDP + 6-P-海藻糖 （6-P-海藻糖合成酶）

5）6-P-海藻糖 ⟶ 海藻糖 + Pi （6-磷酸海藻糖酯酶）

总反应：2 葡萄糖 + 2ATP + UDP ⟶ 海藻糖 + 2ADP + UDP + PPi + Pi

在一些昆虫中，对海藻糖的调节与该糖在血液中浓度有关，由此确定反应被抑制的水平。海藻糖作为反应终产物影响其运出脂肪体到血液中的速度。这个速度也取决于那些以海藻糖作为能源的组织的吸收速率。

产生海藻糖的抑制特性，随虫种不同而异。在那些以碳水化合物为唯一能源的昆虫

（如丽蝇）中，6-磷酸海藻糖酯酶有一个第二活性部位。这个部位在正常情况下，使酶以较慢的速度水解6-磷酸葡萄糖，但可被海藻糖激活。因为6-磷酸葡萄糖是生成海藻糖反应中的底物，水解部位的活化将减少海藻糖的产生。因此，随着系统内海藻糖的增多，在6-P-磷酸葡萄糖酯酶上磷酸葡萄糖部位的活化，又将增加6-磷酸葡萄糖的水解速度，导致海藻糖合成的减少。

涉及到糖原的合成和分解反应，也可能影响到海藻糖水平。因为UDP-葡萄糖也是该反应的中间产物。

糖原是动物细胞中普遍存在的多糖，对昆虫来说相当重要。尽管它在不同组织和不同发育阶段中含量不同，但是在利用碳水化合物的昆虫中，它为飞行和其他活动提供基础能量。在那些突然需要葡萄糖的组织内（例如蝇的飞行肌），糖原可直接被转化利用，当糖原从脂肪体通过血液运输时，它被分解为1-磷酸葡萄糖（通过脂肪体糖原磷酸化酶的作用），并且可以合成海藻糖。

糖原的分子量达到100 000×$10^3$u，外部的支链较短，在酶的作用下能完全分解为葡萄糖。

糖原的合成试验中发现，在脂肪体和飞行肌中加入葡萄糖，通过α（1,4）糖苷键连接到糖原分子上，其中需要糖原合成酶（UDP-葡萄糖-糖原转移糖苷酶）的作用。少数可能通过1，6支链糖苷键聚合而成。

UDP-葡萄糖+(葡萄糖)n⟶UDP+(葡萄糖)$_{n+1}$（糖原）

6-磷酸葡萄糖激活的糖原合成酶，在不同昆虫中也有差异。对UDP-葡萄糖的km值来看，它在蜜蜂（*Apis mellifera*）幼虫中有作用，而在惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）的幼虫中却没有作用。这和前面讨论过的海藻糖的合成相结合，充分证明6-磷酸葡萄糖是调节海藻糖和糖原合成的中心，在一定的组织内，这两种物质合成的相互关系很大程度上取决于合成过程中参与酶的作用。对于惜古比天蚕蛾幼虫脂肪体酶的研究表明，就UDP-葡萄糖来说，6-磷酸葡萄糖合成酶体系更容易利用UDP-葡萄糖。

另外，必须指出，在昆虫体内还有第三种贮藏物质——几丁质，即β（1，4）-N-乙酰葡萄糖胺的多聚体。它是昆虫表皮的1种主要结构化合物，是由皮细胞产生的，通过UDP-N-乙酰葡萄糖胺和它们的结合而成为壳糊精（chitodoxtran）多聚体，催化这个反应的酶即几丁质酶，它结合在皮细胞膜的外表面，将穿过膜的物质合成为多聚体。这种高分子的化合物在昆虫体内可以被再利用，有些饥饿昆虫的内表皮厚度变薄，反映了在蜕皮液中几丁酶的产生和存在，内表皮被消化和吸收。

## 3 脂类的合成

如前所述，脂肪被酯酶或脂肪酶水解后，以甘油和游离脂肪酸的形式进入中肠肠壁。对蝗虫和蜚蠊的研究说明，在肠壁细胞中部分游离脂肪酸重新合成为甘油磷酸酯和甘油酯，并且以甘油二酯的形式释放到血液中，这些甘油二酯结合到载体蛋白上，成为可溶的，被运送到脂肪体中进行重新合成或贮藏。大部分甘油直接从肠壁进入血液再到达脂肪体。

脂肪体是游离脂肪酸、甘油二酯和甘油三酯从头合成的主要场所。几乎所有的脂都是以甘油三酯、甘油二酯和游离脂肪酸的形式贮藏于脂肪体中，然后被其他组织利用或吸

收。血淋巴中的甘油二酯所含的脂肪酸与组成甘油三酯的不同。由此可见，甘油二酯不是简单地从甘油三酯水解得到的。这个结论通过蝗虫脂肪体中的几种酶的作用得到了证实：脂酶先把甘油三酯降解为2-甘油一酯，然后在甘油一酯酰基转移酶的作用下，从2-甘油一脂合成1,2,-甘油二酯。甘油三酯贮存在部分脂肪体中，而在另一部分脂肪体中先行分解，然后再重新合成为不同的甘油二酯，释放进入血淋巴。

## 4 氨基酸的合成

在昆虫血淋巴中，氨基酸的浓度变化取决于消化和吸收的蛋白质，也取决于本身的内部合成。不同组织、不同的代谢活动，负责被消化的蛋白质的吸收利用。在那些已经作过详细研究的昆虫中，某些氨基酸在血液中的浓度似乎只反应了这种氨基酸在食料中的有或无，而一些氨基酸（如酪氨酸或脯氨酸）可以被高度调节。

在血淋巴中，从蛋白质消化而来的氨基酸以L-异构体存在。然而，在个别昆虫的血淋巴中，也有D-型氨基酸及其衍生物，例如氨基酸磷酸盐和氨基丁酸（GABA）。在唾液和防御性分泌物内，也发现有游离的氨基酸和一定的衍生物。

尽管在昆虫中大部分氨基酸都来自消化的食物中，但只是一些对营养来说是必需的氨基酸，即精氨酸、组氨酸、亮氨酸、异氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸。有些昆虫还需要其他氨基酸才能最合适其生长和发育，但是，对绝大多数而言，除了上面列出的必需氨基酸以外，均能以足够的速度从葡萄糖合成出来以满足需要。

能高度调节脯氨酸和酪氨酸，似乎在脂肪体内有它们自己的合成场所或调节场所。例如，由苯丙氨酸经过脱氢作用产生的酪氨酸，在丽蝇幼虫的脂肪体内，与其他氨基酸分离开来，组成贮存蛋白质。这种蛋白含有高浓度的酪氨酸（12%）和苯丙氨酸（10.7%），称为丽蝇蛋白（calliphrin），存在于整个幼虫期内，先释放到血液中，然后进入表皮。在表皮内它作为昆虫表皮硬化和暗化所需要的基质。

## 5 蛋白质的合成

蛋白质的合成在组织的生长发育过程中，发生于体内每一个细胞，它决定了昆虫的形态变化。体内的发育激素在转录和翻译的水平上起调控作用。

有关蛋白质合成的研究大部分是在黄粉甲幼虫体液和几种鳞翅目幼虫的脂肪体及丝腺中进行的。家蚕（*Bombyx mori*）丝腺后部的蛋白质，用来合成丝纤蛋白和丝心蛋白。这种蛋白只含几种主要氨基酸（45%甘氨酸，29%丙氨酸，10%丝氨酸）。因为在游离细胞内，丝心蛋白能从相对纯的mRNA获得信息而被合成，所以家蚕的丝腺内的蛋白质作为丝心蛋白的原料，其合成过程是很有意义的。

蛋白质合成步骤与其他真核生物的情况相似。第一步以一定的氨基酸键合到相应的tRNA上，在这步反应中由专一性酶（氨酰tRNA合成酶）催化完成。

（1）$\text{氨基酸}_1 + ATP + \text{合成酶}_1 \longrightarrow aa_1\text{-}AMP\text{-合成酶}_1 + PPi$

（2）$aa_1\text{-}AMP\text{-合成酶}_1 + tRNA_{aa_1} \longrightarrow aa_1\text{-}tRNA_{aa_1} + ATP + \text{合成酶}_1$

三联体密码是简并密码（每一氨基酸不只是对一个密码子），包括昆虫（如家蚕丝腺）

在内的许多真核生物中，对每个氨基酸而言，不只1个专一性的tRNA和氨酰tRNA合成酶。不同tRNA和同功酶骨架中的合成酶调节昆虫的发育，由不同的mRNA对携带不同的密码子的各个tRNA进行专一性的定位。

第二步涉及到蛋白质合成起始复合物的形成。这种复合物是由1个40S核糖核蛋白体亚基、mRNA、GTP、甲硫氨酰-$tRNA_{met}$以及三个起始因子组成。这个复合物与1个60S的核糖核蛋白体亚基结合，这时起始因子被释放，GTP被水解。激活子$tRNA_{met}$结合到mRNA的起始密码上，40S和60S两个核糖体亚基成为1个有活力的合成单位。在黄粉甲的离体细胞中，已经有人报道了这种复合体的形成（这里也可能发生调节作用，即起始因子的专化性能够决定肽链是否能开始合成）。

第三步是多肽链的延长，由下列程序组成：

（1）第二个乙酰基tRNA的专性结合。$aa_2$-$tRNA_{aa_2}$结合到已经被占据的起始密码子位点后面mRNA-$aa_2$三联体的密码子上（在任何时间，在核糖体上有2个活性部位，受体A是新的氨基酸酰基tRNAaa结合的部位，另1个为肽基部，P位点是已经合成的肽链或起始氨基酸），结合上新的氨基酸。

（2）从P位点和A位点上新结合的$aa_2$-$tRNA_{aa_2}$间的肽链的形成。在A位点上同时伴随着起始氨基酸(或者肽)的释出，在P位点上从它的附着物到密码子的tRNA(这些部位的活性也控制了多肽延长的速度，如核糖体沿着mRNA移动，并使遗传信息得到翻译)。

（3）核糖体沿着mRNA的5’-3’方面移动3个密码子的长度。同时肽-tRNA$aa_2$从A位移到P位。

（4）$aa_3$-$tRNA_{aa3}$复合物结合到A位，再重复第二步。

这些反应需要GTP的参加和两种酶。翻译酶Ⅰ涉及到氨基酸-$tRNA_{aa}$结合到核糖体上；第二个酶（翻译酶Ⅱ或叫易位酶），具体负责肽-$tRNA_{aa}$从A位到P位的转位。开启A位进一步与肽-tRNA结合，所有这些酶的活性已不只在一种昆虫中观察到，且相互间非常相似。

显而易见，合成多肽的复杂反应，可以在任何水平上进行调节，特别对那些合成过程中某些专一性酶的活化或抑制作用。

tRNA或mRNA的产生，以染色体的活化部位为模板（由DNA转录），是在另外的或许更重要的水平上得到控制的。对于RNA聚合酶（这种酶用来进行mRNA和tRNA的合成）的研究已经大有进展，通过发育激素的初期作用，能够在基因水平和反应的产物上给以影响。尽管在昆虫中转录的过程还不太清楚，但许多试验与RNA聚合酶有关。这种酶用于专一性合成3种主要的RNA聚合酶Ⅰ：核糖体RNA；Ⅱ：hnRNA（mRNA的前体物）；Ⅲ：5S和前体4SRNA（tRNA的前体）。已经发现昆虫的RNA聚合酶Ⅲ与tRNA的合成有关，它们与其他真核生物（动物）的RNA多聚酶Ⅲ的物理性有一定差异。

## 第四节 肌肉组织内的代谢

肌肉是动物的主要代谢场所。不同功能的昆虫肌肉、细胞器和微气管（tracheole）的数量和位置都有差异。说明肌肉收缩的能量来源和代谢速率也随虫种和肌肉组织不同而异。

## 1 糖类的利用和糖酵解

有关体壁肌能够贮藏碳水化合物的报道不多，然而，在蝗虫和半翅目昆虫（1种负子蝽 *Lethocerus cordofanus*）的腿节肌上，具有活性的磷酸化酶。这种酶的催化反应为：

(葡萄糖)$_{n-1}$ + Pi ⟶ (葡萄糖)$_{n-1}$ + 1-P-葡萄糖。

表明糖原是能量的主要来源。在管状肌中，经典的糖酵解途径（EMP）如下：

（1）从贮存于肌肉中的糖原开始：

(葡萄糖)$_n$ + Pi ⟶ (葡萄糖)$_{n-1}$ + 1-磷酸葡萄糖　　（糖原磷酸化酶）

1-磷酸葡萄糖 ⇌ 6-磷酸葡萄糖　　（磷酸葡萄糖变位酶）

（2）从血液进入肌肉的海藻糖开始：

海藻糖 ⟶ 2 葡萄糖　　（海藻糖酶）

（3）从海藻糖来的葡萄糖或者直接从血液中来的葡萄糖开始：

葡萄糖 + ATP ⟶ 6-磷酸葡萄糖 + ADP　　（己糖激酶）

然后：

6-磷酸葡萄糖 ⇌ 6-磷酸果糖　　（葡萄糖磷酸异构酶）

6-磷酸果糖 + ATP ⟶ 1,6-二磷酸果糖 + ADP　　（6-磷酸果糖激酶）

1,6-二磷酸果糖 ⇌ D-3-磷酸甘油醛 + 磷酸二羟丙酮（二磷酸果糖醛缩酶）

磷酸二羟丙酮 ⇌ D-3-磷酸甘油醛　　（磷酸三糖异构酶）

2D-3-磷酸甘油醛 + 2NAD + 2Pi ⇌ 2D-3-磷酸甘油磷酸酯 + 2NADH + $2H^+$　　（磷酸甘油醛脱氢酶）

2D-3-磷酸甘油磷酸酯 + 2ADP ⟶ 2D-3-磷酸甘油酸 + 2ATP　　（磷酸甘油酸激酶）

2D-3-磷酸甘油酸 ⟶ 2D-2-磷酸甘油酸　　（磷酸甘油变位酶）

2D-2-磷酸甘油酸 ⇌ 2-磷酸烯醇式丙酮酸 + $2H_2O$　　（烯醇酶）

2-磷酸烯醇式丙酮酸 + 2ADP ⟶ 2 丙酮酸 + 2ATP　　（丙酮酸激酶）

从糖原到丙酮酸的总反应为：

(葡萄糖)$_n$ + 3ADP + 3Pi + $2NAD^+$ ⟶ (葡萄糖)$_{n-1}$ + 2 丙酮酸 + 3ATP + 2NADH + 2H + $2H_2O$

从葡萄糖开始的总反应为：

葡萄糖 + 2ADP + 2Pi + $2NAD^+$ ⟶ 2 丙酮酸 + 2ATP + 2NADH + $2H^+$ + $2H_2O$

与飞行肌相比，步行肌和跳跃肌的线粒体比较少，能量来源可能不同，至少可以说代谢速率不同。绝大多数的步行肌是白色的，尽管在腿肌中“红”、“白”两种肌纤维都有存在（这些纤维可以通过不同的颜色加以区别，与脊椎动物相似），然而，脊椎动物肌纤维的颜色主要依赖于肌红蛋白（myoglobin）和细胞色素（cytochrome）。昆虫体内无肌红蛋白，由较多的细胞色素和较暗的肌纤维构成颜色，而较暗的肌纤维说明其有高浓度的线粒体。在红色肌纤维内，含有更多的线粒体，能量从有氧代谢中获得，比“白色”肌肉更不易疲劳。相反，占绝对优势的“白色”肌肉从无氧代谢获得能量为主，如蝗虫腿肌中有高

浓度的乳酸脱氢酶。丙酮酸到乳酸的形成过程中，糖酵解时还原性 NADH 被重新氧化。

2 丙酮酸 + 2NADH + $2H^{+}$ ⟶ 2L-乳酸 + $2NAD^{+}$

乳酸是先从肌肉扩散到血液中，然后在脂肪体内被氧化的，或者由肌肉本身在休息的时候慢慢地氧化。

飞行肌中的情况与此不同。飞行肌是绝对的“红色”肌肉或者说是需氧的。对于碳水化合物的利用在伏蝇（*Phormia regina*）中已有详尽研究。在这些昆虫中（像其他从脂肪或氨基酸取得能量的昆虫一样，飞行肌有很多的微气管，有占肌纤维体积 30%～45% 的线粒体）。肌肉中贮存有大量糖原，飞行时在开始 10～15min 内被全部用完，以后，由循环的血糖补充，而这些糖是从嗉囊或脂肪体中得到的。昆虫取食果糖、甘露糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖和葡萄糖后，都能用于飞行 但是，在饥饿的或能量已耗完的蝇中，在取食和飞行开始后，糖类先转换为葡萄糖。

飞行肌中糖原的降解途径和体壁肌中相同。生成丙酮酸的一系列反应在伏蝇和沙蝗（*Schistocerca gregaria*）中也已得到被证实，并明确了反应过程中几个控制点。从静止到飞行过程中，代谢速率上的变化（如伏蝇增加 50 倍），需要有 1 种能在短时间内对信号作出反应的机制，在人为控制的一系列反应中，它们明显起调节反应的作用 如依赖糖原作为最初能量来源的肌肉那样，糖原磷酸化酶是 1 种可以高度调节的酶，在黑丽蝇肌肉中，以 a、b 两种形式存在，构成大约整个肌肉蛋白的 1.5%（图 2-1）。

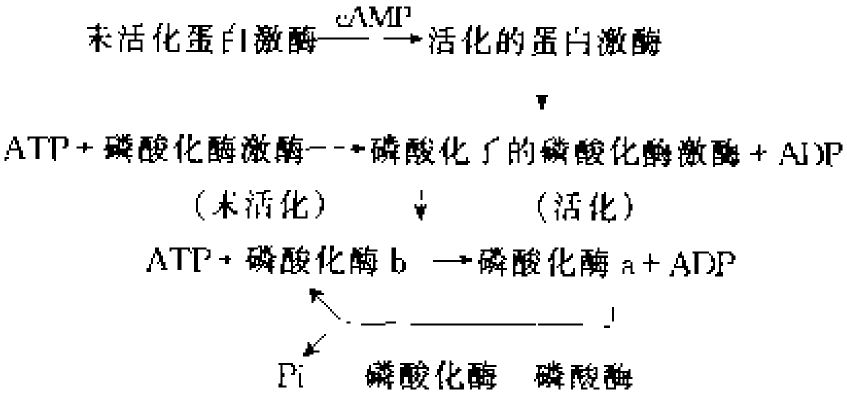



图 2-1 美洲蜚蠊脂肪体中糖酵解体系示意图

a、b 两种形式的磷酸化酶在最适条件下，专一性是相同的。但是最大活力所需条件差异很大，这意味着肌细胞中底物和激活因子水平不同，反应了两种形式酶的活力差异。在 AMP 和 Pi 之间，每 1 种酶的亲和力和可变量之间有密切的关系。通常细胞质中 AMP、Pi 的浓度决定两种酶在体内的活性。在静止的蝇体内，当磷酸化酶 b 的活性忽略不计时，磷酸化酶 a 的活性达到最大值的 50%。

磷酸化酶 b 型可以通过一种磷酸化酶（磷酸化酶 b 激酶），转为 a 型，而磷酸化酶 b 激酶可以被 $10^{-8}$M 的钙离子或 Pi 激活，也可能这两种离子同时激活（在飞行开始时，这两种离子的浓度可能提高）。毫无疑问，激酶的活动导致磷酸化酶 b 转化为 a，使 a 型从整个磷酸化酶活性由 18%增至 70%。高浓度的磷酸化酶 a 能快速把糖原分解为磷酸葡萄糖，以满足飞行肌能量的需要。

高海藻糖激素（hypertrehalosemic hormone），在脂肪体和神经组织中也影响到这种激酶，但在肌肉中无影响。

另外 1 种酶，磷酸化酶 a-磷酸酯酶存在于黑丽蝇飞行肌中，催化磷酸化酶回到 b 型成为无活性状态。蝗虫肌肉中的已糖激酶控制葡萄糖进入糖酵解途径，其浓度和活性依赖于

为飞行肌供能的速度，而反应产物6-磷酸葡萄糖则是己糖激酶的抑制剂，在飞行开始后的短期内，其浓度就高到能抑制的水平。由于当时许多因素导致条件不稳定，因此通过刺激飞行的其他反应产物来补偿。这些产物包括丙氨酸及Pi都可能得到增加，竞争性的逆转葡萄糖磷酸化抑制反应。丙氨酸是1种通过丙酮酸转氨反应生成的氨基酸，由于在三羧酸循环中氧化作用速度像飞行刚开始时那样，使丙氨酸积累，而丙酮酸是糖酵解的终产物；Pi是增加肌肉收缩速度时分解ATP得到的。

在伏蝇肌肉中，葡萄糖代谢的进一步限速反应是由磷酸果糖激酶控制的。同样，在蝗虫肌肉中，这种酶也受1,6-二磷酸果糖和ATP的抑制。ATP是它的底物之一。ATP的抑制作用可以被AMP或Pi所解除，在肌肉活动时AMP和Pi都会得到增加。

## 2 代谢的调控机制

当肌肉开始收缩时，代谢活性增加的主要信号是钙离子浓度上升和腺嘌呤核苷酸分解成ADP和AMP。这些信号能导致整个糖酵解、三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化过程协调的增加，使得ADP磷酸化速度要比ATP水解速度快100倍。

钙离子通过激活磷酸化酶，使得糖原分解速度加快。这对于许多昆虫来说显得格外重要。因糖原是最初几分钟飞行的主要燃料。在这期间，糖原磷酸化酶反应会产生变化，而且该反应没有被激活，缺乏足够的底物来氧化。通过对3-磷酸甘油酯氧化的激活，钙离子浓度上升能迅速提供线粒体氧化和后来ATP合成所需的还原单位，以及维持细胞质中$NAD^+$水平，使糖酵解中磷酸甘油醛脱氢酶反应不断进行下去。

腺嘌呤核苷酸作用于几个不同的控制点。在细胞质中，AMP激活磷酸化酶b、果糖激酶以及通过抑制果糖二磷酸酯酶和阻抑磷酸果糖的再循环来强化对6-磷酸果糖的磷酸化作用。由于在静止和飞行昆虫的肌肉中所测得ADP的总量无多大差别（较小的差别），因此ADP有效浓度的改变就成为重要的调控信号。然而，通过需能的腺苷酸移位酶反应，证明了线粒体基质中ADP浓度比细胞质中高。飞行肌中线粒体基质的体积大致只有细胞质体积的一半，所测得的大量ADP都位于线粒体内。此外，一些ADP与蛋白质（如肌动蛋白和肌球蛋白）结合，掩盖了游离ADP的变化。这些讨论都表明细胞质中ADP要比所测定的总量大，线粒体内ADP浓度变化要比细胞质内的小。即细胞质中最初产生ADP是由肌动球蛋白ATP酶调控，并且线粒体任何变化都服从于该反应。线粒体最终必须对细胞质的ADP变化作出反应，很可能是通过腺嘌呤核苷酸移位酶激活的，这是已知的线粒体内外ADP唯一的结合点。线粒体内其他作用对ADP进入都是次要的。ADP的磷酸化成了部分质子运动的动力，同时导致电子传递的速率增加。ADP/ATP和$NAD^+$/NADH比率的增加能促使异柠檬酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶以及其他一些底物氧化酶的活性增加。在昆虫肌肉中，柠檬酸合成酶反应接近于平衡，所以飞行期间，草酰乙酸轻微的增加就能引起整个反应相当大的波动。柠檬酸的减少可刺激柠檬酸合成酶，这由Johson和Hansford（1975）对丽蝇肌肉的研究得到了证实。

腺嘌呤核苷酸的这些效果，通过一些次要的调节因子得到加强。例如，细胞质的ADP/ATP比率变化可加速磷酸精氨酸的分解，同时又能引起肌肉中正磷酸含量明显增加。由于线粒体内膜上Pi的分布与能量有关，所以线粒体内Pi浓度要比细胞质中高。此

外，飞行开始时质子梯度的减少可使得 Pi 重新分布，并偏向于细胞质区域。这些结论表明细胞质中 Pi 增加量可能高于所测定的量，同时细胞质 Pi 也是一个有效的调控信号，Pi 通过激活磷酸果糖激酶反应来影响糖酵解的速率。

很多有关昆虫三羧酸循环调控方面的资料反映了昆虫飞行肌中的研究结果。在其他昆虫组织中也存在类似调控机制。然而，飞行肌是相当专一的组织，因其代谢大部分是分解代谢。在昆虫其他组织（如脂肪体）中，调控机制可能因其复杂的代谢功能（包括脂类、碳水化合物、蛋白质和尿酸的合成）而需要修饰。脂肪体比飞行肌具有更广泛的底物运输机制，这些机制使得其他代谢途径得到调控。

## 3 磷酸甘油穿梭系统

昆虫长时间的活动（如持久的飞行或者运动），需要大量能量（如 ATP），因遭遇效率较低的无氧代谢而无法满足，在 EMP 中，NADH 在丙酮酸还原到乳酸中被重新氧化。少量的 $NAD^+$ 不能通过线粒体膜而被分隔在细胞质中，必须以有氧途径在细胞质里重新产生氧化型二核苷酸（通过糖酵解过程中还原反应 $NADH \longrightarrow NAD^+$）。该途径在细胞质内通过磷酸二羟丙酮对 NADH 的酶氧化，以及 3-磷酸甘油的运转（3-磷酸甘油从线粒体外膜可以自由的进入线粒体）来完成。在线粒体内膜上，磷酸甘油通过黄素蛋白（flavoprotein）相连的 3-磷酸甘油脱氢酶的作用，重新氧化为磷酸二羟丙酮。然后被运回细胞质，在细胞质内 3-磷酸甘油再被还原。在线粒体内还原了的黄素蛋白通过线粒体电子传递体系再被氧化。因此，在有氧及线粒体的情况下，磷酸二羟丙酮的催化量能够保证糖原的降解和糖酵解。值得注意的是，2 种电子传递辅酶（$NAD^+$ 和 FP）的氧化还原电位决定了电子被运到线粒体内的传递方向。

3-磷酸甘油穿梭的反应如下：

（1）3-磷酸甘油的产生（在细胞质内无氧条件下）

磷酸二羟丙酮 + NADH + $H^+$ $\longrightarrow$ L-3-磷酸甘油 + $NAD^+$

（细胞质内 3-磷酸甘油酯脱氢酶）

（2）磷酸二羟丙酮的产生（在线粒体内在有氧条件下）

L-3-磷酸甘油 + FP $\longrightarrow$ 磷酸二羟丙酮 + $FPH_2$

（线粒体内 3-磷酸甘油脱氢酶）

总反应：$NADH + H^+ + FP \longrightarrow NAD^+ + FPH_2$

在糖酵解的磷酸甘油脱氢酶反应中，胞质内 $NAD^+$ 形成 NADH，在需氧条件中，通过与分子氧相联系的呼吸链逐渐氧化完成。但呼吸链位于线粒体内，线粒体内膜对 NADH 是不能渗透的，故还原酶的氢不得不间接通过特殊的穿梭系统来转运。完成一个穿梭系统，要求以下条件：

（1）两种脱氢酶，一种在胞质内，而另一种在线粒体内，彼此具有共同的底物和产物。

（2）转运系统穿过线粒体内膜转运底物和产物，它们直接由 3-磷酸甘油与二羟基丙酮磷酸的转换来完成，也可间接以苹果酸-草酰乙酸穿梭实现。

（3）一些酶在胞质内促动 NADH 氧化穿梭。胞质中的 $NAD^+$/NADH 的比率维持到高于在线粒体基质中的水平（Williamson et al，1967）。因为没有机制来打破线粒体膜的屏障而达到

$NAD^+$ /NADH 比率的平衡，所以穿梭逆转了胞质中 $NAD^+$ 的还原，在磷酸甘油穿梭和脯氨酸穿梭体系中，由于脱氢酶的氧化还原电位不同，所以反应方向是不定向的。在两个穿梭系统中，胞质中与脱氢酶连接的 $NAD^+$ 存在一个平衡，这个平衡比相应的线粒体酶更适合底物还原。因为 $NAD^+$ /NADH 较黄素蛋白的氧化还原电位更低。由于苹果酸/草酰乙酸穿梭中，天门冬氨酸和谷氨酸的反向运输是同进入线粒体的质子相联系的，所以穿梭受质子动力的驱动。

磷酸甘油穿梭是这些穿梭系统中首先被发现的（Bücher & Klingen，1958、Zebe et al，1959、Estabrook & Saktor，1958）。在昆虫飞行肌中无论胞质中还是线粒体都有较高活性的磷酸甘油脱氢酶。磷酸甘油穿梭便是昆虫飞行肌中主要的穿梭系统，以此维持飞行中所需的 NADH 高氧化率（Carbtree & Newsholme，1972）。蜜蜂（*Apis mellifera*）中可溶性磷酸甘油脱氢酶占胸部蛋白质的 2.5%，就证明了这些酶的活性（Marquorrdt & Porsemer，1966），穿梭酶也存在于美洲蜚蠊的脂肪体中（Storey and Bailey，1978）。

3-磷酸甘油进入线粒体基质并氧化为二羟基丙酮磷酸，而后被转运回胞质中。但也有证据表明，磷酸甘油脱氢酶位于线粒体内膜的外侧，3-磷酸甘油和二羟基丙酮磷酸的转运是不可能的，支持这一观点的理由是：

（1）在麻蝇（*Sarcophuga borrbata*）（Donnellan et al.，1970）和东亚飞蝗（Klingenberg & Buchholz，1970）中，3-磷酸甘油的铵盐似乎不能渗入到飞行肌线粒体内。

（2）3-磷酸甘油的氧化能被很广范围的底物类似物控制，这些底物不能进入线粒体，因此估计是外部位点上控制。

（3）线粒体内 3-磷酸甘油氧化与高铁化物还原相耦合，尽管有证据表明高铁氰化物不能渗入线粒体，但观察到了这种现象。

（4）3-磷酸甘油酶可被钙离子激活，如果在肌肉刺激期间，胞质中钙离子浓度下降，那么酶是对胞质中的钙离子产生响应的。

3-磷酸甘油在氧化反应发生之前进入线粒体，采用麻蝇（*Sarcophaga nodosa*）飞行肌中制备的线粒体，3-磷酸甘油能使线粒体迅速的膨胀而完成渗入，甚至线粒体经微弱的声波处理，也能使 3-磷酸甘油氧化速率增加，随之线粒体氧化 NADH 的能力也增加。由于"渗漏"的线粒体氧化增加了 NADH，表明线粒体成为磷酸甘油脱氢酶的位点。而且氧吸收率主要取决于完整的线粒体和钙离子的浓度。

昆虫穿梭体系中，3-磷酸甘油穿梭系统还存在若干未解决的问题。一个可供解释的胞质中 NADH 氧化机制是苹果酸/草酰乙酶（或苹果酸/天冬氨酸）穿梭。这是在哺乳幼物组织中提出的（Williamson et al，1973）。由于在蝗虫飞行肌中苹果酸脱氢酶发生在胞质和线粒体中，这似乎合理可行，并且也存在转移酶。但哺乳动物组织的穿梭需要苹果酸和草酰乙酸，天门冬氨酸和谷氨酸及转运系统，是否这些底物被飞行肌线粒体以一定速率转运足以解释飞行过程中 NADH 的氧化，也存在疑点，但是也没理由否认在其他昆虫组织中不存在这个穿梭。

还有 1 个穿梭系统是由 Balbohi（1978）提出，他以伏蝇（*Phormia regina*）飞行肌的实验为基础，从线粒体再构建 1 个穿梭系统，即从匀浆的可溶性碎片的 1-吡咯-5-羧酸被还原为脯氨酸，然后被线粒体再氧化。在此系统中，外部 NADH 仅在加入催化剂 1-吡咯-5-羧酸之后被氧化，这表明该系统是可行的。丽蝇肌肉中该系统和磷酸甘油穿梭对 NADH 的氧化还在进一步研究中。

## 第五节 三羧酸循环

三羧酸循环的酶在线粒体的内膜和基质上。离体条件下，只有那些能进入线粒体内膜的化合物才能进入三羧酸（TCA）循环。例如丽蝇的线粒体只能氧化外源性的丙酮酸和脯氨酸，一些鳞翅目昆虫的线粒体能氧化长链的酰基CoA衍生物及乙酰CoA，蝗虫肌肉能氧化长链酰基肉毒碱化合物以及丙酮酸和丙氨酸，蝉的飞行肌制备物能氧化谷氨酸及α-酮戊二酸，除了这些化合物以外，还没有别的中间产物可以被整体昆虫的飞行肌中线粒体所利用。相反，脂肪体中线粒体对某些化合物是不通透的，从而可以看出飞行肌的专化性功能。

### 1 三羧酸循环的基本反应式

丙酮酸的氧化开始通过三羧酸循环，以下列方程式进行反应：

$$丙酮酸 + NAD^+ + CoA \longrightarrow 乙酰CoA + CO_2 + NADH + H^+$$

（丙酮酸脱氢酶复合体）

$$乙酰CoA + 草酰乙酸 + H_2O \longrightarrow 柠檬酸 + CoA$$ （柠檬酸合成酶）

$$柠檬酸 \longrightarrow 顺乌头酸 \longrightarrow 异柠檬酸$$ （乌头酸酶）

$$异柠檬酸 + NAD^+ + CoA \longrightarrow \alpha\text{-}酮戊二酸 + CO_2 + NADH + H^+$$

（异柠檬酸脱氢酶）

$$\alpha\text{-}酮戊二酸 + NAD^+ + CoA \longrightarrow 琥珀酰CoA + CO_2 + NADH + H^+$$

（α-酮戊二酸脱氢酶复合体）

$$琥珀酰CoA + GDP + Pi \longrightarrow 琥珀酸 + CoA + CO_2 + GTP$$ （琥珀酰CoA合成酶）

$$琥珀酸 + FAD \longrightarrow 延胡索酸 + FADH_2$$ （琥珀酸脱氢酶）

$$延胡索 + H_2O \longrightarrow L\text{-}苹果酸$$ （延胡索酸酶）

$$L\text{-}苹果酸 + NAD^+ \longrightarrow 草酰乙酸 + NADH + H^+$$ （苹果酸脱氢酶）

总反应：$$丙酮酸 + 4NAD^+ + FAD + GDP + Pi + 2H_2O \longrightarrow$$

$$3CO_2 + 4NADH + 4H + FADH_2 + GTP$$

在线粒体中，上面提到的反应速率一般通过ADP、Pi及ATP的相对浓度来调控。这些化合物不仅作为呼吸链的底物，而且也是影响TCA循环的因子。例如脯氨酸脱氢酶在很多双翅目昆虫的线粒体中可以被ADP活化。ADP的作用是降低该酶对脯氨酸的Km值。与$NAD^+$联结的异柠檬酸脱氢酶是三羧酸循环中的1种主要限速酶，它可以被ADP、Pi及它的底物（即异柠檬酸）活化，也可以被ATP及钙离子所控制，还有丙酮酸脱氢酶（1种高度调节的酶）也可以被ATP抑制。而且丙酮酸脱氢酶的酶催化机制（磷酸化产物所激活）与糖原磷酸化酶相似，都可通过激素来调节。

呼吸链收集从三羧酸循环时产生的电子，进而使电子传递给氧，将在电子传递过程中产生的自由能转化为高能磷酸键。

一般认为，从一分子的NADH传递电子到氧的过程中，产生3个高能磷酸键（以ATP的形式），而还原型黄素蛋白（$FPH_2$）的再氧化可以得到2个高能键。

上面所讨论的作为 TCA 循环中产生能量的基础，可以计算出从糖原而来的一个葡萄糖分子的氧化过程中所产生的总的能量如下：

（1）糖原酵解及 3-磷酸甘油途径：

$$(\text{葡萄糖})n + 2NAD^+ + 3ADP + 3Pi \longrightarrow (\text{葡萄糖})_{n-1} + 2\,\text{丙酮酸} + 2NADH + 2H^+ + 3ATP + 3H_2O$$

$$2NADH + 2H^+ + 2FAD \longrightarrow 2NAD^+ + 2FADH_2$$

$$2FADH_2 + 4ADP + 4Pi + O_2 \longrightarrow 2FAD + 4ATP + 6H_2O$$

（2）三羧酸循环：

$$2\,\text{丙酮酸} + 8NAD^+ + 2FAD + 2GDP + 2Pi + 4H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 8NADH + 8H^+ + 2FADH_2 + 2GTP$$

$$8NADH + 8H^+ + 24ADP + 24Pi + 4O_2 \longrightarrow 8NAD^+ + 24ATP + 32H_2O$$

$$2FADH_2 + 4ADP + 4Pi + O_2 \longrightarrow 2FAD + 4ATP + 6H_2O$$

总反应：

$$(\text{葡萄糖})n + 35ADP + 2GDP + 37Pi + 6O_2 \longrightarrow (\text{葡萄糖})_{n-1} + 6CO_2 + 35ATP + 2GTP + 43H_2O$$

图2-2 列出了三羧酸循环及其与其他主要代谢途径有联系的路线。虽然三羧酸循环这一概念的形成建立在对脊椎动物组织的实验结果上，然而现在对昆虫体内也有这一路线已毫无疑问，在飞行肌和脂肪体中的证据最为充分，实际上绝大多数昆虫组织都具有通过这一路线氧化基质的能力。

另一些证据来源于通过组织中成分的测定，基质（如丙酮酸）和三羧酸循环中间代谢物的氧化。其中 1 个主要困难是昆虫线粒体对许多三羧酸循环的中间代物的相对不通透性，线粒体中的大多数组分以极低的速率氧化中间代谢物。然而用超声波处理的线粒体，表现出较高的氧化速率。说明用完整线粒体的不能氧化某一物质，不能作为缺少代谢该物质的酶活力的依据。

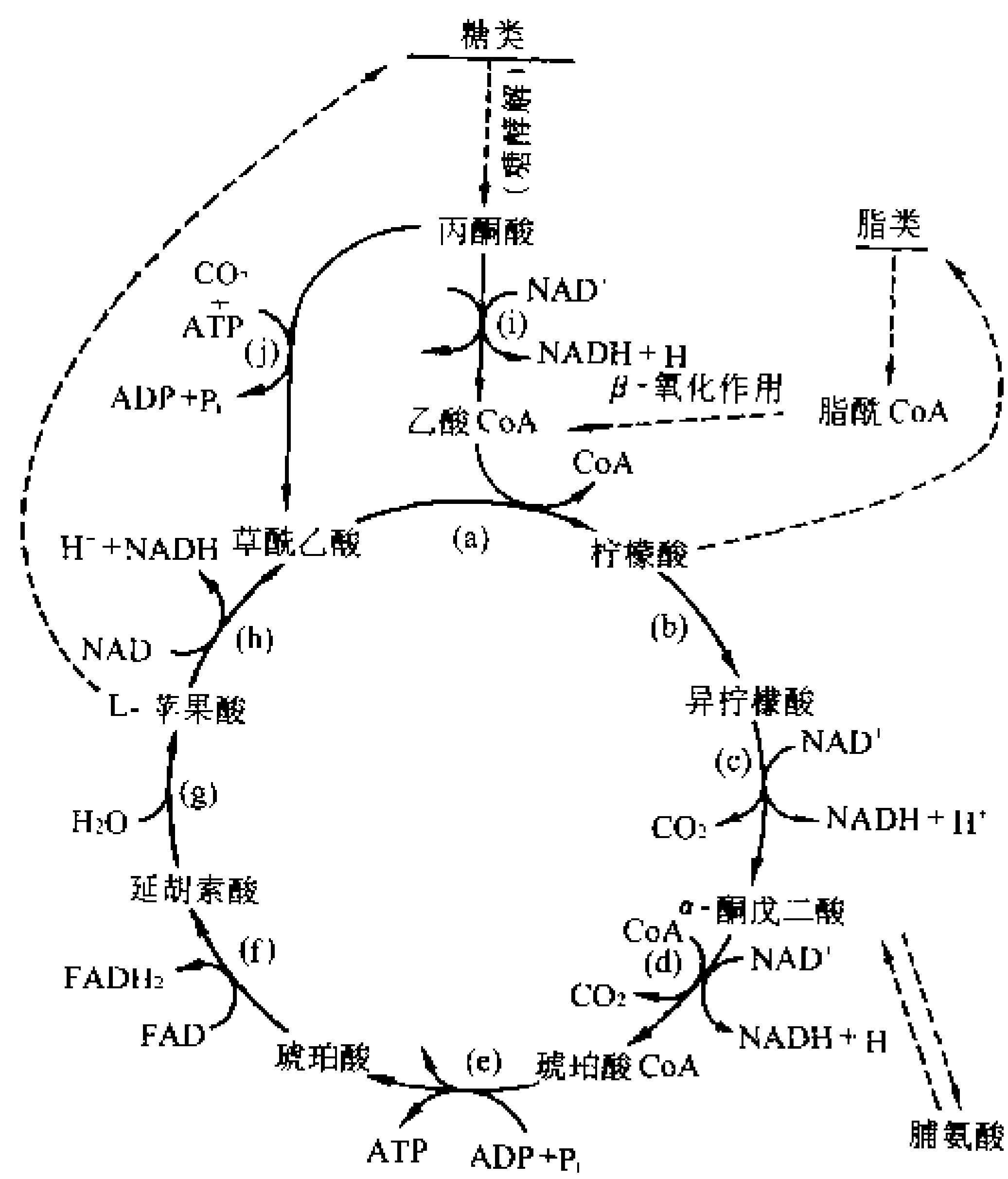



图 2-2　三羧酸循环

（a）柠檬酸合成酶　（b）乌头酸酶　（c）异柠檬酸脱氢酶
（d）α-酮戊二酸脱氢酶　（e）琥珀酸硫激酶　（f）琥珀酸脱氢酶
（g）延胡索酸酶　（h）苹果酸脱氢酶　（i）丙酮酸脱氢酶
（j）丙酮酸羧化酶　为简便起见循环中的所有反应按基质氧化的方向表示

在其他的一些研究中，使用抑制剂来研究代谢，丙二酸、柠檬酸脱氢酶的典型抑制剂可用来阻断三羧酸循环。Van den Bergh（1964）用家蝇（*Masca douestica*）的离体线粒体中的苹果酸抑制了97%的丙酮酸的氧化。同样，Domroese，和Gibert（1964）用苹果酸阻断三羧酸循环显示出惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）的肌肉中的脂肪酸不能完全氧化。三羧酸循环的另一阻断剂是氟乙酸，它被代谢为氟柠檬酸，抑制柠檬酸的代谢。用氟乙酸处理的群居型沙蝗（*Schistocera gregaria*）不能有效地氧化基质而使其积累大量的柠檬酸。

## 2　三羧酸循环的功能

昆虫的三羧酸循环有两个主要功能：

（1）使基质氧化和ADP到ATP的磷酸化耦联。在许多组织中三羧酸循环的主要基质来源于糖类（通过丙酮酸）或脂肪酸的β-氧化。这些内部相互关系见表2-6。此外，许多从食物中直接来的或从细胞组分降解中来的代谢物，也能为三羧酸循环提供基质，其中包括氨基酸、核苷酸、酮类和醇类。

在基质的氧化过程中，ADP通过基质磷酸化（琥珀酸硫激酶）和氧化磷酸化转变为ATP。通过呼吸链在NADH和FADH（由循环中脱氢酶作用阶段产生）的再氧化时发生氧化磷酸化。

（2）为合成反应提供基质三羧酸循环的中间介质是各种细胞组分的合成起点（表2-6），在幼虫期和成虫初期，相当多的代谢产物被用来生物合成。脂肪体是这些合成反应的重要场所，但所有生长的组织都有合成细胞组分的能力。例如，在蝗虫飞行肌的发育过程中能见到其合成能力的变化。在幼虫和成虫初期存在与能量代谢和合成有关的各种酶。在成熟和已分化的组织中，有基质氧化所需要的酶，从而形成ATP。

**表2-6　三羧酸循环中作为合成反应前体物的中间介质**

| 中间介质 | 产物 | 昆虫种类 | 参考文献 |
|---|---|---|---|
| 柠檬酸 | 脂肪酸 | | Storey K 和 Bailey. E　1978 |
| （通过细胞质乙酰CoA） | 乙酰化衍生物，几丁质 | 美洲大蠊<br>沙蝗 | Cardy. K 和 Killy　B. 1962 |
| α-酮戊二酸 | 谷氨酸 | 沙蝗 | Killy B 和 Nerille E，1957 |
| | 谷氨酰胺 | 沙蝗 | Murdock. L 和 Koid. B，1972 |
| | 脯氨酸 | 刺舌蝇 | Bursell. E，1981 |
| 苹果酸 | 糖类 | 美洲大蠊 | Storey K 和 Bailey . E. 1978 |
| 草酰乙酰 | 天门冬氨酸、嘧啶 | 沙蝗 | Killy B 和 Nevnlle E，1957 |

## 3　三羧酸循环中的酶类

通过研究获得了昆虫中有三羧酸循环的可靠证据。其中的一部分证据来源于组织中的相似酶的鉴别（表2-7），早期的文献只报道了组织抽提物中存在必需酶类。通过对酶的最大催化活力的测定获得了更为满意的结果。因为只有活力与组织最大氧化速率相等甚至超过时，酶才在基质氧化的主要途径中起作用。

表 2-7　三羧酸循环中的酶类

| 酶 | 组织 | 昆虫种类 | 参考文献 |
|---|---|---|---|
| 柠檬酸合成酶 | 整个幼虫 | 亚热带夜蛾 | 1 |
| | 飞行肌 | 飞蝗 | 2，3，4 |
| | | 反吐丽蝇 | 4 |
| | | 樗蚕 | 3，4 |
| | | 其他 | 5 |
| | | 膜翅目 | 6 |
| | 脂肪体 | 美洲蜚蠊 | 7 |
| | 神经组织 | 其他 | 9 |
| 乌头酸酶 | 整个幼虫 | 亚热带夜蛾 | 1 |
| | 脂肪体 | 美洲蜚蠊 | 7 |
| | 大多数组织 | 黄猩猩果蝇 | 10 |
| 异柠檬酸脱氢酶 | 整个幼虫飞行肌 | 亚热带夜蛾 | 1 |
| | | 铜绿丽蝇 | 11 |
| | | 飞蝗 | 12 |
| | | 美洲蜚蠊 | 13 |
| | | 秋家蝇 | 13 |
| | | 其他 | 5，14 |
| | 脂肪体 | 美洲蜚蠊 | 7 |
| | 神经组织 | 飞蝗 | 15 |
| | | 其他 | 9 |
| α-酮戊二酸脱氢酶 | 整个幼虫飞行肌 | 亚热带夜蛾 | 1 |
| | | 黑颊丽蝇 | 16 |
| 琥珀酸硫激酶 | 飞行肌 | 黑颊丽蝇 | 17 |
| 琥珀酸脱氢酶 | 整个幼虫飞行肌 | 亚热带夜蛾 | 1 |
| | | 铜绿丽蝇 | 14 |
| | | 樗蚕 | 4 |
| | | 红头丽蝇 | 18 |
| | | 其他 | 3 |
| | 表皮 | 飞蝗 | 19 |
| 延胡索酸酶 | 整个幼虫 | 亚热带夜蛾 | 1 |
| 苹果酸脱氢酶 | 整个幼虫 | 亚热带夜蛾 | 1 |
| | | 铜绿丽蝇 | 11 |
| | 整个成虫 | 果蝇 | 20 |
| | 飞行肌 | 飞蝗 | 8 |
| | 脂肪体 | 美洲蜚蠊 | 7 |

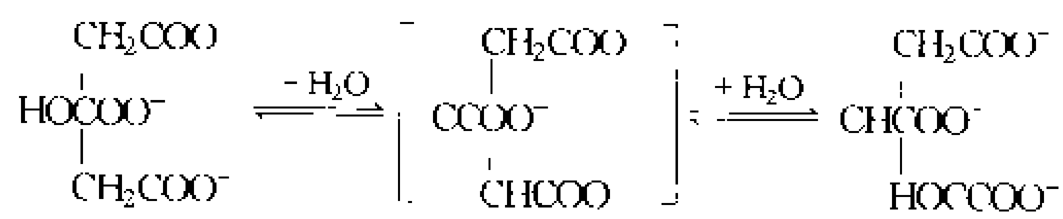
参考：(1) Leverbood, 1961; (2) Zebe, 1960; (3) Beenakkers, 1969; (4) Beenakkers. et al, 1975; (5) Alp et al, 1976; (6) Martin, and Lieb, 1979; (7) Storey, 和 Bailey, 1978; (8) Delbruck et al, 1959; (9) Sugden, 和 Newsholme, 1975; (10) Fox, et al 1972; (11) Lennie, 和 Birti, 1967; (12) Goebell, 和 Klingenberg, 1963, 1964; (13) Ku, 和 Cochran 1971; (14) Zammit 和 Nevsholme, 1976; (15) Strang, et al, 1979; (16) Hansford, 1972; (17) Hansford, 1973; (18) Greville, et al 1965; (19) Surholt, 1976; (20) McReynolds, 和 Kitto, 1970.

## 3.1　柠檬酸合成酶

$$CH_3CO-CoA + \begin{matrix} COCOO^- \\ | \\ CH_2COO^- \end{matrix} \xrightarrow{+H_2O} \begin{matrix} CH_2COO^- \\ | \\ HOCCOO^- \\ | \\ CH_2COO^- \end{matrix} + CoA$$

柠檬酸合成酶使反应向柠檬酸生成方向。在许多细胞中该反应被认为是绝对不可逆的，然而，也有人认为昆虫飞行肌中该反应存在可逆性（ALp 等，1997）。因为酶的最大催化活力大大超过了肌肉氧化的活力。在舌蝇（*Glossina morsitans*）中发现，飞行肌中柠檬酸合成酶的活性很高。但这些种类的昆虫以氧化脯氨酸作为主要能源，它们仅仅利用了三羧酸循环的一部分（从 α-酮戊二酸到苹果酸）来氧化脯氨酸。

### 3.2 乌头酸酶

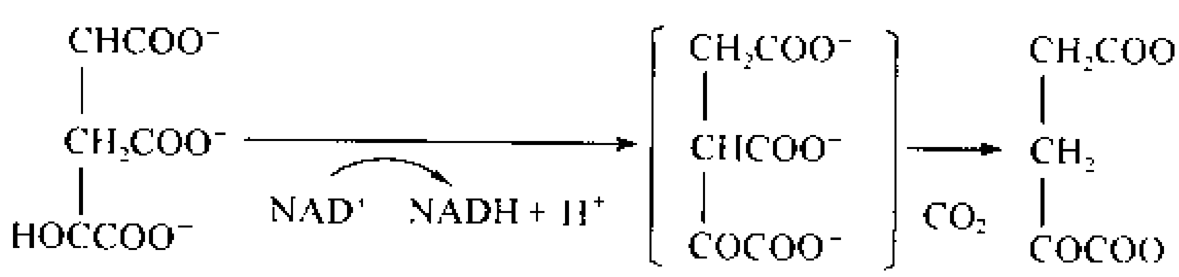


乌头酸酶反应平衡着 3 种三羧：柠檬酸、异柠檬酸和顺乌头酸。顺乌头酸有未与酶结合的或与酶结合的 2 种中间介质。游离的顺乌头酸可能并不是三羧酸循环必不可少的中间介质。

柠檬酸是 1 种前体分子，它的两个 $CH_2COO^-$ 基团可根据其与连在中心 C 上其他基团的空间结构相区别。乌头酸酶使柠檬酸发生异构，产物异柠檬酸的羟基来源于草酰乙酸的 C-3 原子，而不是乙酰 CoA 的 C-2 原子。这由 Wood 等（1941）首先提出，后来又被 Potter 和 Heidelberger（1949）进一步证实了。蝗虫脂肪体中的乌头酸酶也有此特性。

大多数组织中乌头酸酶的活性超过三羧酸循环的最大速率所需要的，因而在一般生理条件下该反应能充分发生。

### 3.3 异柠檬酸脱氢酶



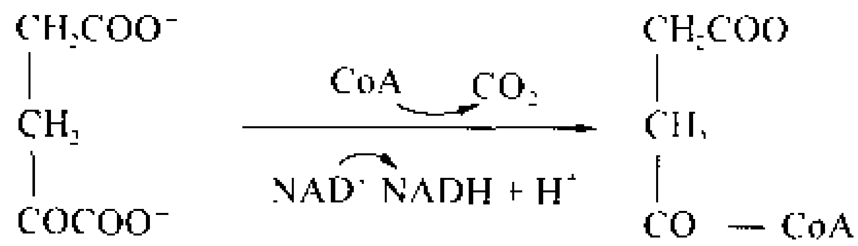
在昆虫组织中已发现有两种类型的异柠檬酸脱氢酶，这同脊椎动物中一样。1 种是对 $NAD^+$ 专一的辅酶，而另 1 种则专对 $NADP^+$。$NAD^+$ 连接酶有可能对三羧酶循环中的异柠檬酸氧化起作用，至少在有线粒体酶的昆虫肌肉中有此作用，并表现出比 $NADP^+$ 连接酶高得多的活性。$NAD^+$ 的这一特性使飞行肌中 $NAD^+$ 浓度高而 $NADP^+$ 浓度极低，甚至根本不存在一致性。$NAD^+$ 连接的异柠檬酸脱氢酶形成线粒体蛋白（同苹果酸脱氢酶和细胞色素 a）稳定的组分，表明催化系统的 3 个功能的一体性。$NADP^+$ 连接的异柠檬酸脱氢酶与 $NAD^+$ 连接的异柠檬酸脱氢酶的活性比有一定差异，根据不同组织及同一组织的不同发育阶段而异，这表明两者功能并不相似。

在其他动物的组织中，$NADP^+$ 连接的异柠檬酸酶活性相当高，它能在三羧酸循环中起作用（Alp 等，1976）。昆虫中一些 ATP 合成的专一性不及肌肉中有线粒体 ADP-异柠檬酸脱氢酶。在一些组织中已测到脱氢酶反应（Horie 和 Chefurka，1966）。此反应能使

NADPH 通过电子转移系统被氧化。NADP-异柠檬酸脱氢酶存在于细胞质中而不是线粒体中，它不可能在三羧酸循环中起作用。它的作用可能是为生物合成而产生 $NADP^+$。

因为 NADP-异柠檬酸脱氢酶是 1 种不稳定的酶，所以在飞行肌中很难通过实验来研究此酶。它在三羧酸循环中起着重要的调节作用，但在大多数生理条件下该反应不能发生。

### 3.4　α-酮戊二酸脱氢酶复合体



Levenbook（1961）发现亚热带夜蛾（*Prodenia eridania*）的 α-酮戊二酸脱氢酶需要 CoA、$NAD^+$、镁离子和焦磷酸硫胺素辅羧酶，它能被 α 砷酸盐所抑制，这些特性同哺乳动物及细菌相似。有关酶的详尽的研究表明，反应被一酶复合体催化。此反应包括：

（1）依赖焦磷酸硫胺素辅羧酶的脱羧作用，产生琥珀酸半焦磷酸硫胺素半醛辅羧酶复合体；

（2）四碳产物转移到硫辛酸上，伴随着基质的氧化形成琥珀酰二氢硫辛酸；

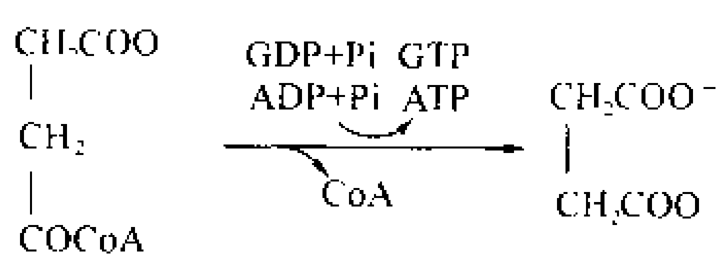
（3）随琥珀酰基的转移而形成琥珀酰 CoA；

（4）二氢硫辛酸氧化成硫辛酸与 $NAD^+$ 还原耦联。

大量生物体中存在着上述反应，昆虫食物中需要焦磷酸硫胺素作维生素，因而很有可能昆虫的 α-酮戊二酸脱氢酶也具有上述机制。

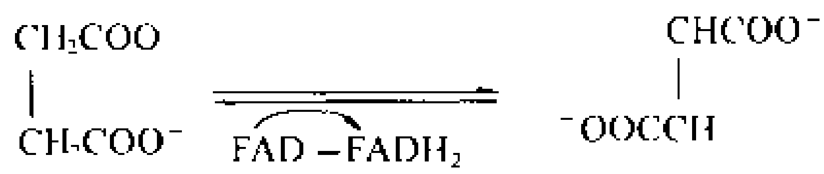
此反应是不可逆的，并可能有调节作用。

### 3.5　琥珀酸硫激酶（琥珀酰—合成酶上 ATP 的产生）



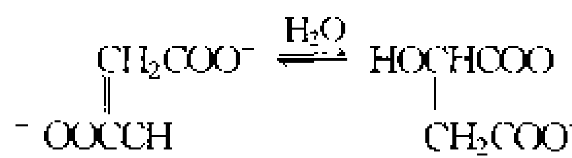
此反应中琥珀酰盐上去除 CoA，同二磷酸嘌呤核苷酸的磷酸化耦联，这是三羧酸循环中唯一的“基质水平的磷酸化”的发生位点。在哺乳动物中主要是 GDP（或 IDP）磷酸化，基本上不存在 ADP 的作用。而从反吐丽蝇（*Calliphora erythrocephala*）的飞行肌中部分纯化得到的酶主要以 ADP 作为辅酶，其他核苷酸几乎不表现活性。飞行肌是一种特化组织，除了 ATP 外它几乎不需要其他的三磷酸核苷酸，但有一些组织用各种三磷酸核苷酸来合成核酸、蛋白质和二磷酸核苷糖。可能这些组织中的琥珀酸硫激酶对核苷酸有着不同于飞行肌的特异性。在线粒体中产生的三磷酸核苷酸用于细胞质中的生物合成。三磷酸核苷酸的可替代的来源是二磷酸核苷硫激酶催化的二磷酸核苷的磷酸化。在蝗虫的脂肪体中已发现有此酶存在。

### 3.6 琥珀酸脱氢酶




与其他氧化酶（苹果酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶）不同，琥珀酸脱氢酶仅存在于线粒体中。从哺乳动物及反吐丽蝇（*Celliphora erythrocephala*）中发现它紧密结合在线粒体内膜上。因此，组织匀浆液中用亚细胞碎片检测琥珀酸脱氢酶可作为线粒体的标记。

### 3.7 延胡索酸酶（延胡索酸水解酶）




延胡索酸酶对延胡索酸的双键起加水反应，并产生异构，从而对 L-苹果酸的反应起催化作用。昆虫中的延胡索酸酶缺乏详细研究。此酶的活性足以使反应达到平衡。

### 3.8 苹果酸脱氢酶

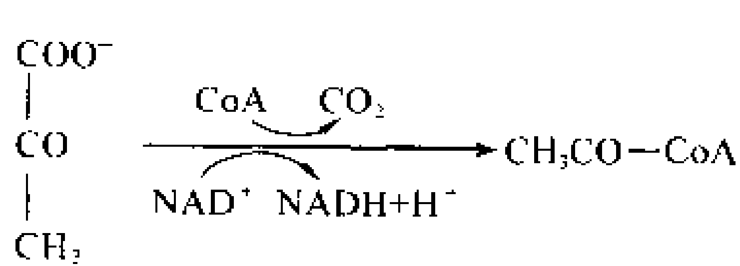



在线粒体中 $NAD^+/NADH$ 间比率增大时，苹果酸脱氢酶反应向着苹果酸生成的方向进行，从而使草酰乙酸的浓度大大低于苹果酸的浓度。在一些组织中，如美洲大蠊（*Peripaneta americana*）的脂肪体中，线粒体和细胞质中都有苹果酸脱氢酶。在黄猩猩果蝇成虫的匀浆中发现了苹果酸脱氢酶的同功酶，由此推测上述酶可能是同功酶，它作为线粒体酶在三羧酸循环中起作用，而细胞质中的酶在糖异生中起作用。

## 4 三羧酸循环相关的其他酶

除了在三羧酸循环途径中直接起作用的酶以外，还有许多对三羧酸循环有间接作用的酶。它们的作用是为循环提供基质（如丙酮酸脱氢酶），补充循环中间介质（如丙酮酸羧化酶）或者是使基质浓度保持一定的稳定性（如肉毒碱乙酰转移酶）。

### 4.1 丙酮酸脱氢酶复合体

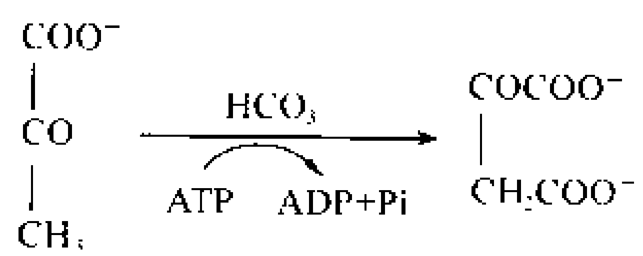


丙酮酸脱氢酶反应是联系糖酵解和三羧酸循环的纽带，它为三羧酸循环提供由糖类转化来的介质及氨基酸，这是不可逆的生理反应。由于其产物乙酰 CoA 不能用来合成糖，此反应后，糖类不可逆地完全氧化或进行脂肪酸的合成。

在哺乳动物和细菌中丙酮酸脱氢酶反应被多酶复合体催化。由专一的激酶催化丙酮酸脱氢酶的磷酸化。其活性比非磷酸化形式的酶要低，因而丙酮酸脱氢酶的调节依赖于激酶和磷酸酶及相对活性，决定活性形式酶的比例。激酶和磷酸酶受到代谢的调节，从而使活性形式的丙酮酸脱氢酶比例随 $NAD^+$、ADP 和丙酮酸而升高，随 NADH、乙酰 CoA 而降低　钙离子也能促进丙酮酸脱氢酶的活化。哺乳动物的酶更为复杂，它发生多位点磷酸化（酶上 3 个不同位点被磷酸化），每个位点都有不同的磷酸化和脱磷酸化的动力学位点，并在酶的调节中起着不同的作用。

昆虫组织中的丙酮酸脱氢酶具有相同的调节特性。Roche 等（1980）发现烟草天蛾（*Manduca sexta*）脂肪体中有此酶，也有活性非磷酸化和非活性磷酸化形式的转化。这两种形式的转化由激酶和磷酸酶催化，丙酮酸脱氢酶被 $NAD^+$ 和 CoA 浓度升高而激活，而 NADH 和乙酰 CoA 使酶失活。在幼虫生长期和在饥饿昆虫中注射葡萄糖后，糖类降解最为激烈时活性形式的酶也明显增至最多。反吐丽蝇的飞行肌中也有受磷酸化和去磷酸化调节的丙酮酸脱氢酶。

### 4.2　丙酮酸羧化酶




此反应具有两个主要功能：第一，是为三羧酸循环合成草酰乙酸，从而保持乙酰 CoA 的持续氧化所需的草酰乙酸水平，尽管大多数用于柠檬酸合成的草酰乙酸来源于循环中的中间介质，一些副反应（如转氨作用）使可利用的中间介质减少，丙酮酸羧化酶反应则用来弥补这种损失；第二，是为糖异生提供草酰乙酸。

丙酮酸羧化酶存在于蝗虫脂肪体和许多种昆虫的飞行肌中，该酶在飞行肌中被乙酰 CoA 激活。这是草酰乙酸的浓度太低而限制乙酰 CoA 代谢时促进草酰乙酸合成的激活机制。

### 4.3　肉毒碱乙酰转移酶

$$乙酰\ CoA + 肉毒碱 \longrightarrow 乙酰肉毒碱 + CoA$$

从飞蝗（*Locusta migratoria*）和伏蝇（*Phromie regina*）的飞行肌中可得到肉毒碱乙酰转移酶，但蜜蜂（*Apis mellifera*）飞行肌中没有此酶。它主要位于线粒体中。

肌肉中的肉毒碱乙酰转移酶能通过可氧化途径的快速变化，使乙酰 CoA 水平避免大幅度的波动。Childress 等（1966）推测在飞行的起始阶段，肉毒碱接受来自 CoA 上的乙

酰基，重新产生游离的 CoA，糖酵解中通过丙酮酸转化为乙酰 CoA 而继续进行下去。伏蝇在飞行初期肌肉中的乙酰肉毒碱含量上升了 4 倍，同时丙酮酸的含量也上升了 4 倍。

肉毒碱乙酰转移酶的另一功能是转移乙酰 CoA 中的乙酸到线粒体中，首先，细胞质中的肉毒碱乙酰转移酶将乙酰基转移到肉毒碱上，然后乙酰肉毒碱被转移到线粒体中，并在另一肉毒碱乙酰转移酶作用下，重新产生乙酰 CoA。这可能并不是肌肉中的重要机制，因为大多数乙酰 CoA 都由丙酮酸或长链脂肪酸在线粒体中代谢而来。

### 4.4 苹果酸酶

$$\text{L-苹果酸} + \text{NAD (P)}^+ \longrightarrow \text{丙酮酸} + CO_2 + \text{NAD (P) H} + H^+$$

苹果酸酶又称苹果酸脱氢酶（脱羧）。NAD-和 NADP-苹果酸连接的酶在昆虫组织中都有发现。在美洲大蠊（*Periplaneta americana*）的脂肪体中有 NADP-连接酶，它是只存在于细胞质中的酶（Storey 和 Bailey1978），其作用可能是为还原性的合成反应（如脂肪酸的形成）产生还原性 $NADP^+$。此酶也存在于黄猩猩果蝇（*Drosophila melanogaster*）整体匀浆液中，其 3 龄幼虫初期酶的活性非常高，并随着食物中糖类增加而增加，随着脂类的增加而降低（Geer，等，1978），这与酶的功能相一致。

在一些以氧化脯氨酸作为主要能源的昆虫肌肉中，存在 NAD-苹果酸连接的酶，其功能是提供丙酮酸后通过转氨作用形成丙氨酸。

## 5 昆虫的乙醛酸循环

乙醛酸循环需要三羧酸循环中的一些酶及另外两种酶（异柠檬酸酶和苹果酸合成酶），其作用是从乙酰 CoA 合成二羧酸，因而通过醛酸循环和糖异生能够由乙酸或脂肪酸合成糖。这一循环也存在于生长在以乙酸作为其唯一的碳源的细菌中。主要能源在种子中的脂肪，植物幼苗及许多脊椎动物的肝脏中也有存在。对取食高脂肪食物和储存脂类的昆虫以及形成几丁质和其他碳水化合物的昆虫蛹期来说，乙醛酸循环具有重要意义。

昆虫体内也有相反的结果。据 Carpenter 和 Jaworski（1962）报道，亚热带夜蛾（*Proenia eridenia*）中的异柠檬酸酶极少。在杂拟谷盗（*Tribrolium confusum*）中也得到同样的结果。在烦扰伊蚊（*Aedes sollicitans*）和美洲大蠊（*Periplaneta americana*）中发现了苹果酸合成酶，但没有异柠檬酸酶。乙醛酸可通过甘氨酸的氨基化或尿酸的降解产生。因而，乙醛酸代谢酶本身并不能证明乙醛酸循环的存在。例如，通过哺乳动物肝脏的匀浆标记的乙醛酸容易与苹果酸和柠檬酸结合，但在哺乳动物中未确证有乙醛酸循环。

通过跟踪标记基质的代谢也能证实乙醛酸循环的存在。Chino 和 Gilbert，（1965）发现在惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）中不能发生由 [$^{14}C$] 乙酸或 [$^{14}C$] 软脂酸到糖类的转化，这表明不存在乙醛酸循环和糖异生作用。相反，Sridhara 和 Bhat（1965）发现在家蚕（*Bombyx mori*）中软脂酸能转化为糖类，然而这并不能证明乙醛酸循环的存在。因为来源于软脂酸的标记乙酰 CoA 与三羧酸循环的中间介质相结合，并由此通过糖异生作用产生标记的糖类，这不需要从脂肪来合成糖。标记物通过同位素的替换而结合到被标记物上。若检测出不同产物形成时间段，利用标记前体就能证实乙醛酸循环的存在。

## 6 白蚁的有氧和无氧代谢及三羧酸循环

Slaytor 等（1997）报道了象白蚁（*Nasutitermes walkeri*）的能量代谢。在 25℃ 时每头白蚁耗氧量为 85.90 ± 1.68nmol/h，二氧化碳的产量为 88.40 ± 2.29nmol/h，RQ 值 = 1.03。说明白蚁和共生菌主要能源物质是糖类，包括葡萄糖、木糖、丙酮酸、丙氨酸、α-酮戊二酸和乙酸。在白蚁组织中糖酵解和三羧酸循环的关键酶以及乙酰 CoA 合成酶都有活性，而不存在丙酮酸脱氢酸。主要催化回补酶是苹果酸酶（依赖 NADPH），在后肠的共生菌中。从丙酮酸脱氢酶复合体和完全的三羧酸循环证明存在有氧代谢，而三羧酸循环是由 α-酮戊二酸脱氢酶活性得到证明。后肠的共生菌具有丙酮酸—铁氧化还原蛋白氧化还原酶（Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase）活性，证明了它们的无氧代谢。用除去肠道的虫体和后肠脱肛的白蚁，在 $^{14}C$ 标记的基质中温浴，研究酶的有氧和无氧控制，结果见图 2-3。其中丙酮酸的浓度变化对氧的利用和乙酸的积累有影响。

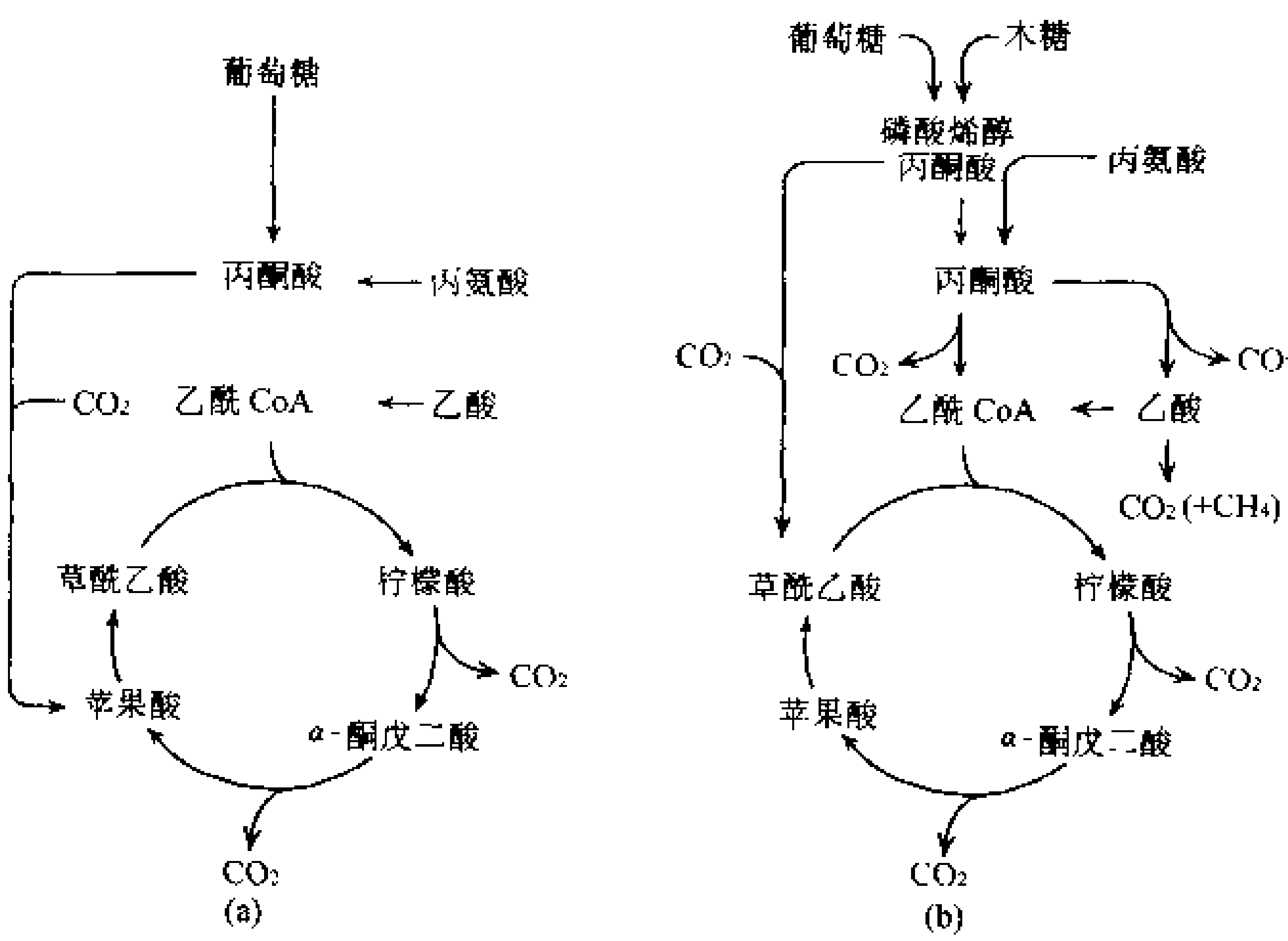



图 2-3 象白蚁在有氧和无氧条件下的三羧酸循环
（a）去肠的白蚁 （b）破坏后肠的白蚁
（仿 Slaytor，1997）

## 7 三羧酸循环的调控

已有 3 种试验方法研究过三羧酸循环中底物氧化的调控作用。第一，测定昆虫组织中代谢物的浓度，并将这些浓度对应于昆虫不同的生理状况；第二，研究离体酶的活性，同时检测这些酶的活性是否受到那些具有潜在调节信号的细胞代谢物的影响；第三、用离体的线粒体研究底物氧化速度的控制。对这种线粒体反应也可应用于活体昆虫或组织的其他试验中。

所有这些研究方法均有缺点，它们很难解释活体昆虫中代谢调节的结果。只有通过不同试验方法的综合，才能推测活体内三羧酸循环的调节机制。下面讨论的结果都是在昆虫

飞行肌中进行的。这种在相当单一的组织中获得的结果，对其他组织的代表性如何，还不能完全确定。现在依次讨论这3种试验，从中能得到一些有价值的信息。

### 7.1 代谢物的浓度

有关飞行肌中代谢中间体含量的测定已有过大量研究，尤其是通过对静止和飞行的肌肉中代谢物量的比较，来阐明可能存在的调节效应。这种方法主要基于这样的假设：在一个非平衡的调节反应中，底物的相对浓度在运动时要低于静止状态时。另外，有时所调节的反应产物其激活浓度会出现一个上升值。

代谢物和辅酶浓度变化的测量，可以用来表明哪些可能充当代谢活动的信号。即它们的有效百分浓度的变化可作为代谢物指示剂。这与有关酶调节特性的资料相一致。这些调节特性包括检验所测得代谢物浓度的变化，证实是否具备有效的量及其变化的合适范围，以及在细胞内对酶活性的实际影响。

根据这类实验资料，很难推断组织中不同部位（细胞外液、细胞质、线粒体）代谢物的分布。这对于那些出现在细胞质和线粒体中的代谢物（苹果酸、柠檬酸）具有特别的重要性。因为还不能推断不同部位的代谢物浓度的变化程度和方向是相同的。基于相似的原因，从所测得的含量来计算代谢物的实际浓度有时很困难。然而，可通过某些假定（如糖酵解的中间体仅出现在细胞质中），并推测不同部位的大小，就能合理可靠地计算出细胞内一些中间体的浓度。用昆虫肌肉研究的优点之一是其线粒体对中间体的渗透性比哺乳动物线粒体的更小。所以，比起其他一些组织，中间体在肌肉各部分间的再分布不再是个问题。

Bücher 和 Klinigenberg（1958）最早测定了飞蝗（*Locusta migratoria*）飞行肌中代谢物的浓度。发现飞行120min后，基质（糖原、海藻糖）大量减少，但无任何中间体积聚。在无氧条件下，3-磷酸甘油和丙酮酸量上升，但对飞行肌来说，缺氧并非正常状态。从飞行昆虫中已经获得证实，在肌肉运动期间无过量的中间体累积现象。由此推断，氧化代谢的途径被有序地控制着，以便底物彻底氧化成二氧化碳。这和其他类型肌肉在飞行时积累乳酸不同，表明糖酵解的波动远大于三羧酸循环。

Sacktor. 和 Wormser-Shavit.（1966）研究了伏蝇（*Phermia rdgina*）在飞行期间代谢物的变化情况。飞行开始后几秒钟内，代谢水平发生明显变化。而当达到新的稳定状态时，许多代谢诱导物的浓度又恢复到静止时的值。这表明突然开始时，由于ATP需求的突然改变，使得代谢途径中各个部分的速度均存在短期的调节机制。直到几分钟后各部分的波动又重新趋于相同。用沙蝗（*Schistocerca gregaria*）和飞蝗（*Locusta migratoria*）试验表明，蝗类的碳水化合物氧化调节与蝇类相似。

飞行开始时，肌肉中丙酮酸含量出现突增现象，当持续飞行时，其含量接着向控制水平方向减少。飞行开始后1min内，丙氨酸含量也明显增加，随后在长时间飞行中，其含量有较少的下降并达到一个稳定的水平。这些研究结果表明，线粒体中糖酵解过程的碳水化合物转变为丙酮酸的速度起初较丙酮酸氧化速度快。丙酮酸活化代谢的短暂延搁是由于丙酮酸进入线粒体的速度或丙酮酸脱氢酶的活性不足以应付丙酮酸增加的速度。然而，不久以后，丙酮酸氧化被活化，并且在短时间内超过了丙酮酸合成的速度，最终丙酮酸合成

和分解的速度相匹配，达到稳定状态。

丙氨酸大概和丙酮酸转氨反应存在一个近似的平衡。丙氨酸形成所需的氨基在丽蝇中可能来自脯氨酸。飞行开始 1min 内，脯氨酸含量明显减少，但量并不相当，可能利用了其他氨基酸。一般认为，脯氨酸首先被氧化成谷氨酸，随后在谷氨酸和丙酮酸间发生转氨反应，产生丙氨酸和 α-酮戊二酸。

这些结果表明，飞行开始后，脯氨酸氧化被迅速地激活。这种激活可能是由脯氨酸脱氢酶刺激引起的。脯氨酸氧化具有两方面的功能：①Sacktor 和 Childress（1967）提出由脯氨酸而来的 α-酮戊二酸所增加的量使得三羧酸循环中间体的水平提高，并能提供氧化乙酰 CoA 所需的较多的草酰乙酸的催化量。如果飞行开始时，循环中间体的水平限制了柠檬酸合成的速度，这种功能就是很重要的；反对这种观点的是，离体的丽蝇线粒体在脯氨酸或其他循环中间体缺乏时，表现出基质快速氧化，同时认为这些中间体在活体线粒体内具足够的量。然而，脯氨酸氧化将使循环中间体水平上升。这对于某些生理状态具有重要意义。②脯氨酸快速氧化为飞行起始提供能量。据此，在飞行几秒钟内，要求从可利用资源快速反应来满足。ATP 的重新合成部分来自精氨酸磷酸化，部分来自于细胞质中糖酵解，部分来自线粒体内 3-磷酸甘油醛和脯氨酸的氧化。短暂的调节之后，丙酮酸彻底氧化被完全激活，达到提供长期持续所需的大量能量。

脯氨酸氧化的两个功能并不是相互排斥的，二者之间的重要性随昆虫种类的不同而异。在舌蝇和一些甲虫中，提供能量的功能得到一定程度的发展，脯氨酸氧化可为飞行提供更多的燃料。

三羧酸循环的所有中间体在任何一种昆虫中均未得到充分的研究。因为一些中间体的浓度很低，测定起来比较困难。一般认为，飞行开始时，苹果酸浓度增加将引起循环中间体由早期的如柠檬酸和异柠檬酸到后来的中间体的重新分布。如果异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶被激活，这将产生后来的中间体以及通过脯氨酸氧化或丙酮酸的羧化作用将一些新的中间体带入到循环中（表 2-8）。

**表 2-8 肌肉由早期静止到飞行转换期间，三羧酸循环及有关反应的中间体含量变化**

| 代谢物 | 浓度（μmol/g） | | 种类 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|
| | 静止 | 飞行 | | |
| 丙酮酸 | 0.20 | 0.80 | 伏蝇 | 1 |
| | 0.06 | 0.36 | 沙蝗 | 2 |
| | 0.33 | 0.73 | 飞蝗 | 3 |
| | 0.09 | 0.24 | 飞蝗 | 5 |
| 丙氨酸 | 2.8 | 4.0 | 伏蝇 | 1 |
| | 1.4 | 5.3 | 沙蝗 | 2 |
| | 1.1 | 2.5 | 飞蝗 | 3 |
| | 1.0 | 2.2 | 飞蝗 | 5 |
| 脯氨酸 | 6.7 | 5.3 | 伏蝇 | 1 |
| | 7.9 | 5.9 | 沙蝗 | 2 |
| | 15 | 13 | 飞蝗 | 3 |
| | 15 | 13 | 飞蝗 | 5 |

（续）

| 代谢物 | 浓度（μmol/g） | | 种类 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|
| | 静止 | 飞行 | | |
| 苹果酸 | 0.6 | 1.1 | 伏蝇 | 1 |
| | 0.5 | 0.8 | 伏蝇 | 4 |
| | 0.2 | 0.3 | 沙蝗 | 2 |
| | 0.5 | 0.9 | 飞蝗 | 3 |
| | 0.09 | 0.24 | 飞蝗 | 5 |
| 柠檬酸 | 1.3 | 2.1 | 烟草天蛾 | 6 |
| | 0.03 | 0.03 | 伏蝇 | 1 |
| | 1.1 | 0.7 | 伏蝇 | 4 |
| | 0.8 | 0.2 | 沙蝗 | 2 |
| | 1.0 | 1.2 | 飞蝗 | 3 |
| | 4.3 | 1.7 | 烟草天蛾 | 6 |
| α-酮戊二酸 | 0.27 | 0.27 | 伏蝇 | 1 |
| | 0.09 | 0.10 | 伏蝇 | 4 |
| | 0.10 | 0.09 | 沙蝗 | 2 |
| | 0.15 | 0.20 | 飞蝗 | 3 |
| 草酰乙酸 | 0.002 | 0.0034 | 沙蝗 | 2 |

伏蝇和烟草天蛾为胸部鲜重，沙蝗和飞蝗为肌肉鲜重，飞行一栏中数值为飞行3min后所记录的最大或最小值。

参考文献：（1）Sacktor 和 Wormser-Shavit.1966；（2）Rowan 和 Newsholme.1974；（3）Worm 和 Beenakkers，1980；（4）Johnson 和 Hansford，1975（5）Kirstein，et.al.，1963；（6）Hansford，et al.，1976

循环中中间体平衡的移动问题，焦点集中在柠檬酸含量的变化上。因为柠檬酸早期较其他中间体具有更高的浓度。Sacktor 和 Wormser-Shavit.（1966）等都报道过飞行过程中柠檬酸的量无显著变化。而 Rowan 和 Newsholme（1979）与 Johnson. 和 Harsford.（1975）发现飞行过程中柠檬酸含量显著减少，这由异柠檬酸比例相应减少得到证实。目前有关证据倾向于赞同柠檬酸和异柠檬酸含量减少的看法，这就意味着飞行过程中，异柠檬酸脱氢酶活性增加。

通过对飞行和静止状态时昆虫肌肉抽提物的辅酶浓度的测定，发现在飞行肌的 ATP 含量中，腺嘌呤核苷酸减少较少，与之相对应的是 ADP 和 AMP 得到增加。在伏蝇（*Phormia regina*）中，AMP 的增加量大于 ATP 的量。AMP 的浓度是腺嘌呤核苷酸磷酸化最有效的信号（表 2-9）。

**表 2-9 肌肉由静止到飞行转换期间辅酶含量的变化**

| 辅酶 | 浓度（μmol/g） | | 种类 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|
| | 静止 | 飞行 | | |
| ATP | 7.0 | 6.4 | 黑丽蝇 | 1 |
| | 5.1 | 4.3 | 沙 蝗 | 2 |
| ADP | 1.5 | 1.9 | 黑丽蝇 | 1 |
| | 0.4 | 1.1 | 沙 蝗 | 2 |

（续）

| 辅酶 | 浓度（μmol/g） | | 种类 | 参考文献 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| | 静止 | 飞行 | | |
| AMP | 0.13 | 0.29 | 黑丽蝇 | 1 |
| | 0.06 | 0.12 | 沙　蝗 | 2 |
| 无机磷酸 | 6.8 | 7.8 | 黑丽蝇 | 1 |
| | 9.3 | 13.5 | 沙　蝗 | 2 |
| 磷酸精氨酸 | 3.1 | 2.0 | 黑丽蝇 | 1 |
| | 6.5 | 4.0 | 沙　蝗 | 2 |
| 精氨酸 | 4.5 | 7.3 | 飞　蝗 | 5 |
| CoA | 0.06 | 0.06 | 沙　蝗 | 3 |
| | 0.027 | 0.024 | 黑丽蝇 | 3 |
| 乙酰 CoA | 0.06 | 0.06 | 沙　蝗 | 2 |
| | 0.06 | 0.023 | 飞　蝗 | 8 |
| | 0.019 | 0.019 | 黑丽蝇 | 3 |
| 琥珀酰 CoA | 0.009 | 0.015 | 黑丽蝇 | 3 |
| 乙酰肉毒碱 | 0.27 | 0.08 | 沙　蝗 | 2 |
| | 0.09 | 0.34 | 黑丽蝇 | 6 |
| NADH | 0.06 | 0.18 | 黑丽蝇 | 4 |
| $NAD^+$ | 0.65 | 0.56 | 黑丽蝇 | 4 |
| | 0.84 | 0.66 | 烟草天蛾 | 7 |

黑丽蝇和烟草天蛾为胸鲜重，飞蝗和沙蝗为肌肉鲜重

参考文献：（1）Sacktor 和 Hurlbut.1966；（2）Rowan 和 Newsholme.1979；（3）Hansford.1974；（4）Hansford.1975；（5）Kirsten. 等 1963；（6）Childress 等 1966；（7）Hansford 和 Johnson.1976；（8）Worm 等 1980

腺嘌呤核苷酸含量的测定值并不能表明它在细胞质和线粒体中的实际浓度。细胞质中 ATP/ADP 比率很可能要高于线粒体基质中的比率。从这些研究中可推测离体线粒体的一些特性，即通过能量连接腺嘌呤核苷酸移位酶的线粒体，在外部介质中能够维持较高的磷酸化优势。说明每个核苷酸的一小部分与蛋白质特别是肌球蛋白和肌动蛋白复合，因此，无法确切估计游离核苷酸的浓度。然而，所有含量变化的测定均表明了飞行中浓度的变化向着预料的方向改变。因此，腺嘌呤核苷酸显然有助于酶活性的调节。

飞行开始时，无机磷酸含量的增加大约和精氨酸含量的减少相对应。这可能是因为精氨酸磷酸激酶的作用。昆虫中，该反应能维持在平衡状态。因而，当细胞质中 ATP 减少时，磷酸精氨酸也减少，而磷酸和 ADP 的量则增加。无机磷酸存在于细胞质和线粒体的基质中，而磷酸至线粒体内的耗能运输，将使得基质中无机磷酸的浓度较高。

直接测定伏蝇飞行肌中 $NAD^+/NADH$ 的比率表明，近 90% 的 $NAD^+$ 呈氧化态。如果酶具有维持反应物平衡所需的活性，通过对脱氢酶反应产物浓度的计算，可间接得到单个细胞内 $NAD^+/NADH$ 的比率。例如飞蝗的飞行肌中，因细胞质中磷酸甘油脱氢酶具有高度的活性，所以通过 3-磷酸甘油和磷酸二羟丙酮的相对浓度可计算细胞质中 $NAD^+/$

NADH 的比率。从沙蝗（*Schistocera gregaria*）肌肉中测定，其比率处于 1 430/1～2 660/1 之间（具体数值取决于使用底物的水平）。Rowan 和 Newsholme（1979）计算沙蝗飞行肌中细胞质的 $NAD^+$/NADH 比率为 1 100/1。静止的飞蝗中比率为 1 100/1，而飞行 3min 后其比率为 2 200/1。线粒体基质中 $NAD^+$/NADH 比率的计算可利用谷氨酸脱氢酶反应物的浓度来计算。在飞蝗中，静止值约为 6/1，飞行 3min 后为 8/1。所有这些细胞质和线粒体中比率均类似于哺乳动物的肝脏和心脏中测定的结果。随着运动的持续，线粒体中 $NAD^+$ 更多地趋于氧化态，这与用荧光法测定蛙的肌肉和哺乳动物心脏的结果相一致（表 2-9）。

除了 Worm 等人（1980）的研究外，飞行开始时，CoA 及其衍生物的含量变化相当小，而且认为这些化合物仅起着较小的调节作用。尽管在代谢过程中存在各种变化，乙酰 CoA 的形成速度必须和类似柠檬酸合成酶转运的速度相匹配。然而，由丙酮酸形成乙酰 CoA 的速度比其他代谢物平缓（由于丙酮酸氧化的延搁）。所以在乙酰 CoA 浓度变化不明显的情况下，柠檬酸合成能渐渐地适应这种波动。

上述工作已在用碳水化合物作为燃料的丽蝇中进行过研究。在开始飞行的短期内用碳水化合物为燃料的蝗虫中也研究过。这有助于以脂类为燃料的蛾类及半翅目臭虫的代谢变化研究。用葡萄糖或葡糖加丁酸作为外源底物，注入蝗虫肌肉中，当丁酸被氧化时，柠檬酸浓度增加，这种增加可能通过调节醛缩酶反应抑制糖酵解来实现。对蝗虫在长时期飞行中控制碳水化合物和脂类的氧化之间的平衡具有显著的作用。然而在 Worm. 和 Beenakkers.（1980）对蝗虫飞行试验研究中，虽然飞行 120min，长链酰基肉毒碱增加了 10 倍，但代谢物浓度值在 5min（碳水化合物为主要燃料）和 120min（脂类为主要燃料）值之间无显著差异。

## 7.2 酶的调节特性

用无细胞抽提液或使用部分的提纯酶来研究昆虫组织中酶的调节特性，要注意离体酶与活体酶的差异程度如何，以及效应物浓度是否达到一个有效程度，是否需要超过合适的浓度范围才改变细胞内酶的活性？某个酶的活性被体外代谢物的影响并不具有生理上的重要性。如磷酸果糖激酶能被 ATP 抑制，但由于 ATP 浓度在不同的生理条件下变化相当小，所以 ATP 的直接作用对反应的调节意义较小。

表 2-10 中所列的许多结果都具有潜在的调节意义。一般来说，三羧酸循环的辅酶（NADH 和 ATP）都是能降低酶活性的效应物，而 ADP、AMP 和 $NAD^+$ 则刚好起相反的作用。通过这些作用，三羧酸循环部分可由 ADP/ATP 和 $NAD^+$/NADH 比率来调控，当这些比率增加时，将会激活底物的氧化。

NAD-异柠檬酸脱氢酶是三羧酸循环中一个重要的调节酶，由 Goebell 和 Klingenberg（1964）从蝗虫肌肉中提取的需要额外的 ADP 才能显示它的活性。这不仅解释了以前 NAD-连接酶很难发现的原因，而且提供了三羧酸循环的腺嘌呤核苷酸的调节机制。NAD-异柠檬酸脱氢酶依赖 ADP 的反应在其他很多昆虫中也得到了确认。昆虫飞行肌中 NAD-异柠檬酸脱氢酶的最大活性要低于三羧酸循环中其他的酶，此后 Alp 等（1976）确立了该酶催化一个非平衡的调节反应，此酶在线粒体内受到钙离子浓度的调节。

**表 2-10 三羧酸循环及相关反应酶的调节效果**

| 酶 | 效应物 | 类型 | 种类 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|
| NAD 异柠檬酸脱氢酶 | ADP | + | 几种 | 1 |
| | | + | 美洲大蠊 | 3 |
| | | + | 秋家蝇 | 3 |
| | | + | 沙蝗 | 4 |
| | | + | 黑颊丽蝇 | 5 |
| | | + | 红头丽蝇 | 6 |
| | | + | 绿蝇 | 7 |
| | ATP | - | 几种 | 1 |
| | | | 黑颊丽蝇 | 5 |
| | Pi | + | 黑颊丽蝇 | 5 |
| | NADH | - | 黑颊丽蝇 | 5 |
| | 异柠檬酸 | + | 黑颊丽蝇 | 5 |
| | | + | 美洲大蠊 | 3 |
| | | + | 家蝇 | 3 |
| | $Ca^{2+}$ | - | 沙蝗 | 4 |
| | | - | 负子蝽 | 4 |
| | | - | 红头丽蝇 | 6 |
| α-酮戊二酸脱氢酶 | ADP | + | 红头丽蝇 | 6 |
| 苹果酸脱氢酶 | 草酰乙酸 | - | 果蝇 | 8 |
| | | - | 飞蝗 | 9 |
| 柠檬酸合成酶 | 柠檬酸 | - | 黑丽蝇 | 10 |
| 丙酮酸脱氢酶 | （共价修饰） | | 黑丽蝇 | 11 |
| | | | 烟草天蛾 | 2 |
| 丙酮酸羧化酶 | 乙酰 CoA | + | 沙蝗 | 12 |
| | | + | 田园熊蜂 | 13 |
| | ADP | - | 田园熊蜂 | 13 |

参考文献：（1）Goebell 和 Klingenberg.1964；（2）Roche. 等 1980；（3）Ku. 和 Cochran.1971；（4）Zammit. 和 Mewsholme.1976；（5）Hansford 和 Chappell.1968；（6）Hansford.1972；（7）Lennie 和 Birt.1967；（8）MeReynolds 和 Kitto.1970；（9）Delbrück 等 1959；（10）Johnson 和 Hansford.1975；（11）Sackfor.1975；（12）Rowan 等 1978；（13）Crabtree 等 1972

### 7.3 离体线粒体的调节特征

很多研究小组研究了离体线粒体氧化代谢的调节作用。这些实验结果有的彼此完全相反，部分原因是由于所使用的昆虫种类不同或分离线粒体的程序不同造成的。分离线粒体方法在研究代谢控制的试验中特别重要，因为除非细胞器对控制反应的方式在体内与体外相一致，否则这些试验就很少会有生理上的相关性。线粒体的分离一般需 10～60min，其中涉及机械性的和自身组织中酶对线粒体的破碎和解离程度，试验又在与细胞内完全不相同的环境中进行。这些因素都对线粒体的性质有影响。

检测离体线粒体的功能有不同的标准。这些标准中，包括最大呼吸速率的测定、呼吸控制指数（Pi 和 ADP 存在下氧摄入速率与只有 Pi 而无 ADP 的氧摄入速率之间的比率）和线粒体对不同底物与中间体的渗透性。只有破碎的线粒体才表现出氧化作用的增加，并显示 NADH 的能力。

早期对飞行肌线粒体特性的研究表明，3-磷酸甘油氧化比其他底物（如丙酮酸）要快得多，这是令人困惑的。因为对于肌肉中碳水化合物氧化来说，在3-磷酸甘油氧化（产物磷酸二羟丙酮）和丙酮酸氧化至二氧化碳之间存在一个化学当量关系。由于每1mol 3-磷酸甘油的氧化需1mol氧，每1mol丙酮酸氧化需5mol氧，所以体内氧摄入速率的5/6都与丙酮酸氧化有关。关于这种明显差异的解释是：线粒体内磷酸甘油脱氢酶在分离过程中较其本身氧化丙酮酸复杂机制（这需要三羧酸循环中所有酶及大量的$NAD^+$和循环中间体）来说是比较稳定的。类似这些底物造成的差异在哺乳动物的线粒体中也有发现。哺乳动物线粒体中存在的氧化琥珀酸的能力由FAD连接的琥珀酸脱氢酶的氧化要强于由NAD-连接的。计算结果表明，通过离体线粒体中3-磷酸甘油氧化速度而非丙酮酸氧化速度能充分说明飞行期间底物的氧化速度。以后，通过改进分离线粒体的方法，使氧化丙酮酸和3-磷酸甘油具有相似的速度。

在底物和氧存在的条件下，理论上线粒体的呼吸速度在很多方面可以得到控制。潜在的限速步骤包括底物的运输和氧化（如酶的调节）、电子转移、氧化磷酸化和腺嘌呤核苷酸的移位。然而，这些反应都不是相互独立的。因而，在从一个稳定状态向另一个状态变动过程中，所有步骤的速度最终都必须调整到与总的波动速度一致的水平。但是，在移动期间，将存在一个最先对起始刺激发生反应的原始步骤。其他反应步骤将出现在代谢物浓度、辅酶和质子梯度等被第一个反应步骤的新速度所干扰之后。然而，细胞内主要和次要步骤的调节可能一样重要。因为复杂代谢系统的多点调节可以避免中间体浓度的广泛波动。维持浓度的合理水平要求代谢系统对变化作出快速的反应。某种意义上说，第一控制点的确定具有较高的学术价值，因为它是一个重要氧化途径的协同调节点。由于认为昆虫线粒体的最初控制点可能和辅乳动物不一样，有关内容仍需作一些讨论。

哺乳动物肝脏的线粒体，在有合适底物存在下，加入ADP时，$NAD^+/NADH$的比率会上升。这表明通过腺嘌呤核苷酸移位酶的作用，对NADH氧化的刺激效果主要直接或间接地发生在电子传递上。三羧酸循环底物氧化通过$NAD^+/NADH$和ADP/ATP比率的改变而加速。而在哺乳动物线粒体内，Hansford（1972）发现在丽蝇线粒体氧化丙酮酸过程中加入ADP，会引起$NAD^+/NADH$比率轻微下降，在这些条件下，最初控制点是底物氧化，或者是底物运输。NAD连接的异柠檬酸脱氢酶似乎是这种控制最可能的位点。

然而，要发现昆虫线粒体内控制点有许多困难。首先，从所观察的状态4到状态3中，NADH的增加仅仅出现在以丙酮酸或丙酮酸加上脯氨酸作为底物时，当以丙酮酸和3-磷酸甘油作为底物时（1个生理上较合适的混和物），NADH的氧化方向将发生转变。其次，当采用Slack和Bursell（1976）的分离程序提纯线粒体，并且用丙酮酸作为底物研究状态4到状态3的变化时，可观察到细胞色素b向着更氧化的形式转移（$NAD^+$氧化还原态的变化与细胞色素的变化方向相同）。导致这些差异是由于ADP刺激所增加的。对活体内$NAD^+/NADH$比率的测定将有助于分析那些生理情况相类似的线粒体的反应，但这些证据又相互矛盾，如Hansford（1975）发现丽蝇在由静止向飞行转换时，胸部$NAD^+/NADH$总比率下降，而Rowan和Newsholme（1979）则发现蝗虫在同样情况下，线粒体的$NAD^+/NADH$比率却有轻微的增加。

与氧化反应的增加相联系的$NAD^+/NADH$的比率下降，也给三羧酸循环的速度控制

带来大量的理论难题。首先，这个比率的下降将限制以 $NAD^+$ 作为氧化剂的所有脱氢酶的反应速度，这正好与在哺乳动物线粒体中研究得出的结果相反。其次，当假定苹果酸脱氢酶反应接近平衡时，这个结果将进一步减少柠檬酸合成反应的草酰乙酸浓度的限制。此外，蝗虫飞行过程中草酰乙酸浓度是增加的。$NAD^+$/NADH 比率的下降，将减少与苹果酸有关的草酰乙酸的浓度。

### 7.4 钙离子的调节作用

在肌肉收缩循环中，肌浆中游离钙离子的浓度增加可达到两个数量级 虽然最初认为钙离子的增加是用来激活肌动球蛋白 ATP 酶和肌肉的收缩，但是，它也能作为调节代谢反应的有效信号。在丽蝇突然起飞的 5s 之内，肌肉中发生磷酸化酶 b 到磷酸化酶 a 的转移。这种转移是通过钙离子对磷酸化酶 b 激酶的激活。3-磷酸甘油氧化也通过线粒体外钙离子的刺激，但是处于生理浓度范围内的钙离子看来对细胞质中其他许多可能的调节酶不起反应。

有关细胞质和线粒体中钙离子浓度的关系争论较多。一种观点认为线粒体基质中钙离子浓度变化与细胞质中相反。据此，当肌肉受到刺激的时候，肌质网和线粒体将钙离子释放到细胞质中。在异步肌中，线粒体可能是钙离子的来源，因为异步肌的肌质网没有同步肌的发达。这种提法和钙离子对蝗虫肌肉中异柠檬酸脱氢酶的作用相吻合，该反应受到钙离子的明显抑制。当肌肉激活时，线粒体中钙离子下降将激活异柠檬酸脱氢酶。

然而，对非昆虫组织来说，细胞质和线粒体的钙离子之间这种相反的联系存在争论。线粒体内三个酶的活性，包括 NAD-异柠檬酸脱氢酶，由钙离子而得到加强。而丽蝇线粒体中钙离子则不能抑制异柠檬酸脱氢酶。Zammit 和 Newsholmes (1976) 指出，高浓度的锰离子通过 EDTA/钙离子系统能明显地影响游离钙离子的缓冲系统，这说明钙离子不能抑制蝗虫肌肉中异柠檬酸脱氢酶。有的学者指出，因肾上腺素刺激而导致细胞质中钙离子的上升，当它们吸回到线粒体时，能明显地激活丙酮酸脱氢酶。尽管已经知道在同步飞行肌的线粒体中，存在钙离子的高亲和的吸收系统，而且该系统能根据线粒体内钙离子成比例的增加而对细胞质中钙离子的上升作出反应。但在昆虫组织中，还缺乏实验证据。由于钙离子所起的作用小，果蝇异步肌的线粒体可能和哺乳动物中不同。对另外一些肉食性蝇类的肌肉研究表明，线粒体存在一个活性的高亲和力的钙离子吸收系统。不同来源的线粒体对钙离子反应的主要差别、以及线粒体基质和细胞的钙离子浓度变化等都有待进一步研究证实。

## 第六节 电子传递和氧化磷酸化

线粒体中底物氧化产生还原型辅酶 NADH 和 FADH。接着，还原型辅酶通过与 ADP 磷酸化相连接的呼吸链被再氧化。根据 Mitchell 的化学渗透学说理论，通过呼吸链，辅酶氧化产生一个质子梯度和跨膜电位。二者共同组成质子运动的动力或电化学的质子梯度，用来促进与不同能量相连的线粒体的功能。这些功能包括通过膜上 ATP 合成酶对 ADP 到 ATP 的磷酸化和底物与离子逆浓度梯度的运输。

ATP合成的化学当量还没有完全搞清，即每个NADH或FADH的氧化需多少ADP磷酸化？无论是用哺乳动物还是昆虫的离体线粒体来氧化$NAD^+$连接的底物，试验常得到2～3个化学当量（P/O比）。FAD连接的底物P/O比在1.5～2之间，1个NADH氧化产生3个ATP、1个$FADH_2$氧化产生2个ATP。离体线粒体的不完全效能导致比率之间的差异。在电子传递链中有3个连接部位，其中之一就是位于NADH和黄素蛋白之间。化学渗透学说认为，这些部位均对应于产生质子运动动力的部位，且每分子的NADH氧化需要6个质子移位，每个部位上有2个质子移位。因每分子ADP磷酸化很可能又使得2个质子回到线粒体内，所以提出的3/1的化学高量是能让人接受的。

ADP和正磷酸进入线粒体以及ATP从线粒体出来很可能都与能量有关。1个ATP的产生仅有1个质子进入线粒体。如果是1个ADP磷酸化需2个质子移动，整个的化学计量将变成每个ADP磷酸化需3个质子移动。此外，每个NAPH氧化，电子传递过程中可能就多于6个质子，有人认为8个或9个甚至更多。造成这些不确定结果的原因是ATP/NADH的比率没有得到确认。事实上，每当1个NADH氧化有9个质子移动时，这个比率可能是3/1。

由于大多数需ATP的反应都在线粒体外进行，因此，线粒体必须具备ADP和Pi输入及ATP输出的有效系统。正磷酸进入线粒体由$H_2PO_4^-$和$H^+$的运输系统运人（或通过内部$OH^-$和外部$H_2PO_4^-$的互换）。质子梯度保证了$H_2PO_4^-$的进人，使得线粒体能从介质中浓缩磷酸根离子。从黑颊丽蝇（*Calliphora vomitura*）飞行肌分离的线粒体中发现正磷酸聚集需能量参与。

哺乳动物线粒体内部ATP和外部ADP的交换通过腺嘌呤核苷酸的移位作用，这是一个有能量参与的过程。其中$ADP^{3+}$和$ATP^{4+}$互换。因$ADP^{3+}$和$ATP^{4+}$电荷的差异，跨膜电位梯度能促使腺嘌呤核苷酸的移位和ADP的进入。正因为如此，细胞质中ATP/ADP比率要高于线粒体（可达到200倍），同样，离体线粒体的介质能比基质中保持较高的ATP/ADP的比率。尽管Danks和Chappell（1974）的工作已表明丽蝇线粒体内外ATP和ADP能发生交换，AMP的交换则几乎不发生，但对昆虫线粒体中腺嘌呤核苷酸移位酶还是研究较少。

## 1　呼吸链（电子传递链）中的传递电子的载体

吡啶核苷酸连接的脱氢酶的氧化作用水平最低。这种酶从氧化了的底物上转移2个还原态的氢，1个运到吡啶核苷酸辅酶的尼克酰胺环中，另1个以游离的氢离子的形式存在。这类酶以$NAD^+$或$NADP^+$作为辅酶，在线粒体的基质内，已经发现NAD-和NADP-连接的异柠檬酸脱氢酶，以及在线粒体内膜上的α-酮戊二酸脱氢酶的二氢酯酰脱氢酶。

随着吡啶核苷酸脱氢酶作用，就是黄素脱氢酶的作用。黄素是1种与蛋白酶结合牢固的化合物。尽管在昆虫中黄素类辅基的性质还不清楚，但是在动物体内，它已经被证明为黄素单核苷酸（即核黄素磷酸盐）及黄素腺嘌呤二核苷酸。在核黄素分子上的一个环上，氢原子被传输到上面，在该酶系中，琥珀酸脱氢酶存在于线粒体的内膜上。

辅酶Q（CoQ）是1种有侧链的苯结构化合物，侧链长度为30～50个碳。CoQ在昆虫体内电子传递体系中定位于黄素蛋白酶和细胞色素之间，侧链的长度随昆虫的种类不同

而异。因为昆虫不能合成30以上的碳链，一般认为它是从食物中得到的。

昆虫体内的细胞色素b，$c_{551}$，c，a及$a_3$是从CoQ到分子氧之间的电子传递者。这些血红蛋白最早是由Keilin于1925年在大蜡螟（*Galleria mellonella*）的胸部发现的。他发现肌肉收缩时色素浓度的变化，命名这些化合物为细胞色素a，b和c，并且发现当分解食物作为能量供应时，这些化合物将携带的电子转移给氧。此后，对呼吸链的组成方面做了若干工作，最后认为在昆虫和其他的真核生物的电子传递情况是大致相同的，所不同的是在载体的初级结构上的差异。在哺乳动物中那种化合物，由于细胞色素还原态在554nm处具有1个最大的吸收峰，称此为细胞色素$c_1$，而在昆虫的胸肌中，化合物的最大吸收峰在551nm处。细胞色素c的氨基酸顺序，在很多动物中已经作过分析，说明昆虫和其他生物之间存在的氨基酸顺序差异。细胞色素α和$\alpha_3$一起称为细胞色素氧化酶，它们似乎是作为一个整体与氧作用，成为最终的反应。与细胞色素c相似，也是1种易溶的血红蛋白，这种细胞色素已在许多昆虫中分离获得。

昆虫也和其他动物一样，呼吸链中成员的定位用2种方法来确定，利用各种抑制剂与呼吸变化时观察发生化合物的吸收作用的变化。

### 2　二碳的氧化作用

大多数有机体内，肌肉开始活动时需要摄入大量的氧气。因为绝大多数的能量是通过分子氧作为最终氧化剂的氧化作用产生的。昆虫无论以何种形式贮藏能量（碳水化合物、脂肪或氨基酸），绝大部分的高能磷酸化合物（ATP）的能源来自线粒体中沿着呼吸链的电子传递相伴的氧化磷酸化作用。呼吸链与线粒体中的三羧酸（TCA）循环相联系，TCA循环从不同的来源得到底物，如果昆虫代谢的是碳水化合物，通常先在细胞质中通过糖酵解产生丙酮酸，再在线粒体基质内被氧化脱羧，然后以乙酰CoA进入TCA循环；若以脂肪酸形式被利用，其中部分通过β-氧化作用，然后以乙酰CoA的形式进入循环；脯氨酸在转氨作用以后，以α-酮戊二酸的形式进入循环，脯氨酸最终产生二碳化合物，并氧化转氨形成丙氨酸。

合成的必要条件是基质和能量（ATP）的供应，对许多生物合成过程而言，还原剂（常为NADPH）的供应也是必要条件之一。

细胞中各物质间相互转化是降解代谢及合成代谢相结合的结果。然而有一系列的合成反应在昆虫组织内不能完成，如脂肪酸到碳水化合物的转变；特定的必需氨基酸的合成；甾醇类系统的合成。

## 第七节　脂类代谢

昆虫如同其他动物一样，脂类有多种不同的功能。首先，中性脂类尤其甘油三酯是昆虫体内最大的能量储存者，贮藏甘油三酯的主要场所通常是昆虫体内的脂肪体。第二，脂类在细胞的所有膜系统中发挥结构功能，在这方面磷酯和甾醇类最重要。第三，脂类还具有调节功能和传递信息的作用，某些激素（保幼激素）即是脂类，信息素也是挥发性的脂类衍生物。第四，昆虫体表的蜡质有防止水分丧失的作用，从而避免虫体干化。

## 1 分解代谢

由于昆虫体内的大多数脂类贮存于脂肪体内，但它的氧化都在其他部位。因此，脂类分解的第一步是脂类在不同组织间的运输。对蝗虫飞行过程中脂类的运输进行过很好的研究。脂肪体将甘油三酯转变为甘油二酯，随后在血淋巴中以脂蛋白的形式转运。这一过程由飞行时释放的脂肪动员激素调节（图 2-4）。

在肌肉或其他利用部位，甘油二酯如何从脂蛋白的结合中解离下来还知之甚少。来自惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）、沙蝗（*Schistocerca gregaria*）和许多其他昆虫的飞行肌都有脂酶。这类脂酶对甘油二酯和甘油单酯的作用比对甘油三酯的作用更快。通过脂酶的水解，游离脂肪酸和甘油被释放出来。这些游离的脂肪酸和甘油并不积累，而是立即被代谢。当以脂酰肉毒碱的形式运进线粒体以后，游离脂肪酸通过β-氧化作用分解为乙酰CoA，进而通过三羧酸循环分解为二氧化碳。这两个途径都与辅酶的还原相连系，因而通过氧化磷酸化释放出 ATP。

同样由甘油二酯水解释放出的甘油，尽管有些在肌肉中磷酸化和氧化，但大部分被转运到血淋巴。如同在飞蝗“肌肉”（实际上是肌肉加血淋巴）中的情况一样，在沙蝗飞行过程中血淋巴甘油含量有相当大的提高。昆虫一旦停止飞行，血淋巴甘油含量随即下降（Candy 等，1976），而甘油二酯含量协同性地增加。这表明甘油二酯水解的控制是与肌肉收缩紧密联系的。

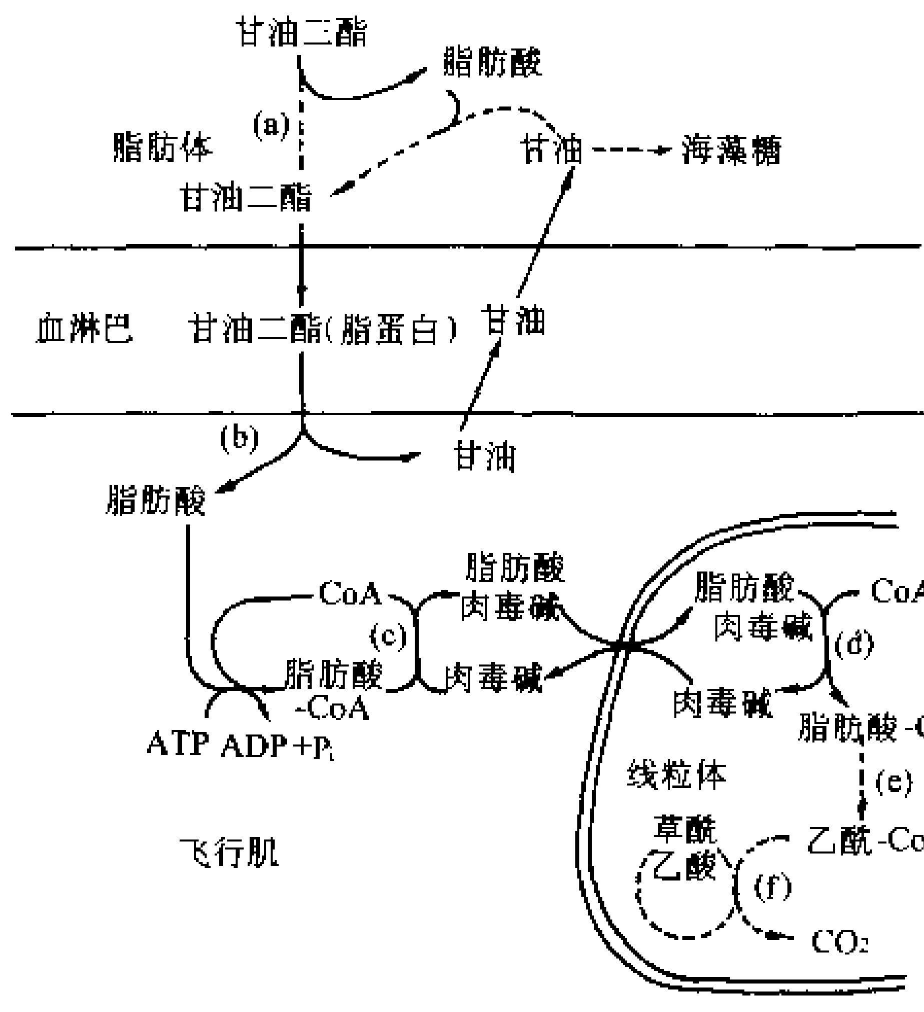



图 2-4 昆虫中脂类的运输和代谢

反应是：(a) 三酯酰甘油转变为二酯酰甘油 (b) 三酯酰甘油水解酶 (c)、(d) 肉毒碱-乙酰转移酶 (e) β-氧化 (f) 三羧酸循环

在蝗虫飞行肌中，至少有 3 种不同的激素影响脂类氧化的速率。Robinson 和 Goldsworthy（1977）提供了脂肪动员激素促进脂类氧化而抑制糖类代谢的证据。Candy（1978）、Goosey 和 Candy（1980）发现章鱼胺通过扩散在胸肌中刺激甘油二酯和糖类的氧化，而且由于血淋巴中章鱼胺的水平在几分钟的飞行中升高十分明显，这一效应产生了重要的生理意义。以后 Goosey 和 Candy（1982）又提出，1 种来自心侧体的激素刺激糖类的氧化，但抑制蝗虫飞行肌中丁酸氧化。这 3 种不同的效应之间如何达到平衡，来为飞行过程中脂类和糖类氧化进行全面调节是一直受人重视的课题。

半翅目蝽类以相当不同的方式利用脂类。这些种类的飞行肌中包含大量用于飞行的甘油三酯，尤其是在飞行最初的 30min 需要利用脂类。这些昆虫可以在没有食物的情况下长

期生活，却只有极少的糖类储藏。因此，不像许多利用脂类的昆虫，在长距离飞行的早期需要氧化糖类。这些蜂类飞行甚至在飞行早期也依赖于它们的脂类贮存，其肌肉中贮存的甘油三酯能提供起飞的即时燃料，此时脂肪体中的脂类就被动员起来。

某些昆虫中脂肪酸代谢的次要产物是酮体，即乙酰乙酸和β-羟丁酸。沙蝗在饥饿期间和飞行中，即使处于脂类分解增加的生理状态下，其血淋巴中乙酰乙酸的浓度也会上升(Hill 等，1972)。酮体在脂肪体中形成，可以被许多组织包括肌肉、脂肪体和睾丸等氧化。由于这些酮体化合物是水溶性的，它们易在血淋巴中运输，而且还是将贮存的甘油三酯转运到氧化部位的 1 种替代方式。酮体在美洲大蠊中可能也是重要的，它在血淋巴中的浓度比蝗虫中的还要高。饥饿会增加血淋巴中乙酰乙酸的浓度和脂肪体中酮体生成的两种关键酶的浓度。这两种酶是羟甲基戊二酰 CoA 合成酶和分解酶。Sugden 和 Newsholme (1973) 注意到沙蝗和折翅蠊的神经组织具有调节酮体来支持能量代谢的能力，特别是当糖类难以得到时会利用酮体。

## 2 合成代谢

除了不能合成甾醇环和聚不饱和脂肪酸以外，昆虫能够合成多种脂类，包括脂肪酸、甘油三酯、磷酯、蜡质和类帖。乙酰 CoA 是合成这些化合物的起点。利用糖类转化为脂肪，在许多种昆虫体内占有相当重要的位置。

在昆虫发育的特定阶段，特别是在幼虫期和成虫早期取食的糖类，相当部分被转化为脂类。这些转换多数是在脂肪体中进行，故在取食期间，这些部位的大量糖类降解，直接变为脂类，而并不用于能量代谢。

Walker 和 Baileg (1970、1971) 证明在脂肪体中存在将糖类转化为脂类的酶系，途径同哺乳动物体内相似。糖类首先在胞质中转变为丙酮酸，然后被转运到线粒体内，再氧化为草酰-CoA。草酰-CoA 由柠檬酸的合成酶转变为柠檬酸，被转运出线粒体，由 ATP-柠檬酸酶作用，产生乙酰－CoA 而成为胞质中脂肪酸合成的底物。脂肪酸合成属还原过程，需要消耗 NADPH。NADPH 通过磷酸戊糖途径由糖类氧化和胞质中 NADP-异柠檬酸脱氢酶反应产生，或由 NADP－苹果酸酶反应提供 (Baileg，1975)。实验表明在昆虫体内脂肪酸合成高的（幼虫阶段，饥饿后再取食的或产卵期雌性）个体，通过磷酸戊糖途径代谢的葡萄糖比例，发现黄猩猩果蝇幼虫喂饲高糖食料时，与喂饲低糖食料的相比，其 6-磷酸葡萄糖降解酶和磷酸葡萄糖酸脱氢酶水平有明显提高。

乙糖类到磷酸丙糖的转换既可通过糖酵解的第一步进行，也可通过磷酸戊糖途径，由此产生丙酮酸，连接糖酵解的后续反应，这一途径为脂肪酸合成产生底物和 NADPH。在美洲蜚蠊脂肪体中催化糖酵解早期步骤的酶（磷酸葡萄糖变位酶、磷酸果糖激酶、醛缩酶）表现反常的代谢活性。由于糖酵解后阶段的酶（磷酸丙糖变构酶、磷酸甘油脱氢酶、磷酸甘油变构酶、磷酸丙酮酸水解酶和丙酮酸激酶）活性很高，脂肪体中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶也很活跃，这表明酸戊磷酸成糖途径也显得特别重要。

另外，为脂肪酸合成 NADPH，可由 NADP-苹果酸酶和 NADPH-异柠檬酸脱氢酶产生。这两者在蝗虫和美洲蜚蠊脂肪体中都存在。

如上所述，游离脂肪酸的合成反应需要苹果酸、$HCO_3^-$ 和 NADPH，它的合成途径和

一般的脊椎动物中的情形相似。在脊椎动物和其他的真核生物中，在细胞质内发现了与脂肪酸合成有关的酶，并且组成1个复合体。在复合体内，1种与丙二酰结合的酰基载体蛋白和另1种与酰基结合的酶（β-酮酰基合成酶）结合，生成与蛋白质结合的酰基化合物（以硫酰链相连）和二氧化碳，从而使酰基化合物增加了两个碳原子，反应如下：

（1）蛋白质结合体的形成

a. 乙酰 CoA + $HCO_3^-$ + $H^+$ + ATP ⟶ 丙二酰 CoA + ADP + Pi　（乙酰 CoA 羧化酶）

b. 丙二酰 CoA + 酰基载体蛋白（ACP）⟶ 丙二酰 ACP + CoA　（ACP 丙二酰转移酶）

（2）结合乙酰基的酶的形成

a. 乙酰 CoA + ACP ⟶ 乙酰 ACP + CoA　（ACP 乙酰基转移酶）

b. 乙酰-ACP + β-酮酰基-ACP 合成酶 ⟶ 乙酰-β-酮酯酰-ACP + 合成酶 + ACP

（3）1b 和 2b 产物间的反应（由 β-酮酯酰-ACP 合成酶催化）

丙二酰 ACP + 乙酰 β-酮酰基-ACP 合成酶 ⟶

乙酰乙酰-ACP + $CO_2$ + β-酮酯酰-ACP 合成酶

（4）乙酰乙酰 ACP 还原为丁酰 ACP，再与酰基结合的酶反应

a. 乙酰乙酰 ACP + NADPH + $H^+$ ⟶ D-β-羟基丁酰 ACP + $NADP^+$

（β-酮酯酰-ACP 还原酶）

b. D-β-羟基丁酰 ACP ⟶ 丁烯酰 ACP + $H_2O$　（烯酰-ACP 水合酶）

c. 丁烯酰 ACP + NADPH + $H^+$ ⟶ 丁酰 ACP + $NADP^+$　（烯酰-ACP 还原酶）

d. 丁酰 ACP + β-酮酯酰 ACP 合成酶 ⟶ 丁酰 β-酮酯酰 ACP 合成酶 + ACP

（5）结合丙二酰的蛋白质与结合酰基的酶反应

丁酰（$C_4$）-β-酮酯酰 ACP 合成酶 + 丙二酰 ACP（见步骤1）⟶

β酮已酰基（$C_6$）ACP + $CO_2$ + β-酮酯酰 ACP 合成酶

（6）在六碳的水平上重新回到反应4，依此类推。

因此，乙酰 CoA 在碳链的甲基端供给两个碳原子，而丙二酰 CoA 供给了脂肪酸中的所有其余碳原子，β-酮酯酰 ACP 合成酶限制了脂肪酸的长度，最后通过硫酯酶（thioesterase）的作用，脂肪酸的游离形式从蛋白质中释放出来。

虽然脂肪酸的生物合成发生在脂肪细胞质内，但它必须从线粒体中得到乙酰 CoA。从线粒体中运出乙酰基可能以1种或2种方式进行。在丙酮酸脱羧后，以肉毒碱的衍生物的形式进入线粒体膜，或通过线粒体内的乙酰 CoA 和草酰乙酸合成柠檬酸，然后进入到细胞质中，在 ATP-柠檬酸裂解酶的作用下，转变为乙酰 CoA 和草酰乙酸。

柠檬酸盐 + ATP + CoA ⟶ 乙酰 CoA + 草酰乙酸 + ADP + Pi

乙酰 CoA 在合成脂时被利用，而草酰乙酸通过细胞质靠苹果酸去氢酶的作用，转变为苹果酸后再回到线粒体参加再循环。

在飞蝗和蜚蠊体内，在不同的体系中高浓度的苹果酸酶，在合成脂的初始阶段，为了增加柠檬酸盐的产生速率，需要增加草酰乙酸的量，草酰乙酸可以从 L-苹果酸酶作用产生，苹果酸是在通过线粒体膜后，在线粒体内被转变为草酰乙酸的。反应如下：

$$\text{丙酮酸} + NADPH + H^+ + CO_2 \xrightarrow{\text{苹果酸酶}} \text{L-苹果酸} + NADP^+$$

$$\text{L-苹果酸} + NAD^+ \xrightarrow{\text{脱氢酶}} \text{草酰乙酸} + NADH + H^+$$

脂肪体中的线粒体，比飞行肌中的线粒体具有更多的功能。并且有1层可以允许大分子化合物通过的内膜。在黄猩猩果蝇（*Drosophila melanogaster*）的线粒体内，除了脂肪酸降解的β-氧化作用（产生能量）途径以外，仍然可以合成长链脂肪酸。因此，这种线粒体具有延长脂肪酸链的能力。

不饱和脂肪酸（仅1个双键）在昆虫体内通过两种方式形成。在蝗虫脂肪体微粒体中$C_{16}$或$C_{18}$酸上的碳原子借助嘧啶核苷酸的还原，通过酶促不饱和化反应；在果蝇中通过$C_{10}$或$C_{12}$的β-羟基酸的β-α-脱水作用，生成$C_3$-烯酸，碳链进一步延长到$C_{16}$或$C_{18}$位，使双键到达$C_9$位。

## 3　脂类的利用

不同种昆虫飞行过程中呼吸商RQ（$CO_2/O_2$）很不相同，不同的RQ值能代表不同的能源，这对于研究昆虫的酶，以便发现它们是否存在种专化性颇有用处。在膜翅目昆虫中，许多虫种的RQ值均为1.0，表明它们利用碳水化合物作为基质，以碳水化合物（如葡萄糖）为燃料，其反应如下：

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

飞行肌的酶与蜜蜂的相似。糖酵解酶活性很高，脂类降解酶活性很低。而过去认为鳞翅目昆虫利用的是脂肪（如软脂酸），其RQ为0.7。即：

$$C_{16}H_{32}O_2 + 23O_2 \longrightarrow 16CO_2 + 16H_2O$$

荨麻蛱蝶（*Vanessa urticae*）中的酶可以说明这一点，丫纹夜蛾（*Plusia gamma*）的情况不同，其体内有高活性的碳水化合物代谢酶以及高活性的脂肪降解酶。大量的鳞翅目昆虫根据RQ估计，它们并非全部利用脂肪。实际上，黏虫（*Spodoptera frugiperda*）飞行时同样能利用糖和脂。那些取食糖类，并对糖有趋性的鳞翅目成虫，能够利用碳水化合物。那些在幼虫期贮存了大量营养而在成虫期吃得很少或者根本不取食的昆虫，主要依赖脂类供给能量。脂是1种比糖更为有效的贮存物，每1g脂肪可以释放比糖更多能量。由于脂肪的高还原状态，贮藏中通过水合作用，体积较小，更易于贮存，并且每克分子能够释放更多的水。

最有趣的是许多昆虫（例如蝗虫和蜚蠊）贮存糖和脂，总是先利用糖，在持久飞行时，糖用完后才利用脂。在生物化学方面，这种现象与脂动激素的调控是一致的。

飞行肌内脂的代谢途径与其他动物体内发现的情况相似。贮存于脂肪体内的甘油三酯可能在被转化为这种或那种形式。然后以甘油二酯（惜古比天蚕蛾 *Hyalophora cecropia*、飞蝗 *Locusta migratoria*）、游离脂肪酸（烟草天蛾 *Manduca sexta*、大蜡螟 *Galleria mellonella*、马得拉蜚蠊 *Leucophaea maderae*）或甘油三酯（美洲大蠊 *Periplaneta americane*）的形式释放到血淋巴中。在血淋巴中，脂与专一性载体蛋白结合，然后以结合蛋白形式运进肌肉。不少昆虫都是从脂肪体释放甘油二酯，这些昆虫体内的载脂蛋白对甘油二酯来讲是专一性的。到达肌肉后，脂由脂酶水解，释放出脂肪酸作为能源进行运转。昆虫体内有足够的甘油二酯酶，可以生产必需的游离脂肪酸。

脂肪一旦被降解，甘油几乎全部回到脂肪体内进行再循环，而游离脂肪酸在线粒体内

被氧化。为了通过线粒体膜，在大多昆虫体内脂肪酸必须被转换为酰基 CoA 的衍生物，再转换为酰基-肉毒碱衍生物。肉毒碱（carnitine，亦称维生素 $B_t$），化学结构为 3-羧基-4-三甲基-氨基丁酸，是拟步甲科中少数几种生长所必需的，在很多动物肌肉和酵母体内已有发现，并且浓度很高。乙酰 CoA-肉毒碱转移酶存在于线粒体膜的内外两侧，催化下面的反应：

$$\text{乙酰 CoA} + \text{肉毒碱} \rightleftharpoons \text{乙酰肉毒碱} + \text{CoA}$$

乙酰基一旦进入到线粒体内，即为膜内的酶所氧化。

脂肪酸在线粒体中的β-氧化途径如下：

软脂酰 CoA + FAD ⟶ $\triangle^2$-反-棕榈油酰 CoA（十六碳烯酰 CoA） + $FADH_2$

（酰基 CoA 脱氢酶）

$\triangle^2$-反-棕榈油酰 CoA + $H_2O$ ⟶ L-3-羟基十六碳酰 CoA

（烯酰 CoA 水合酶）

L-3-羟基十六碳酰 CoA + $NAD^+$ ⟶ 3-酮基十六碳酰 CoA + NADH + $H^+$

（3-羟基酰基 CoA 脱氢酶）

3-酮基十六碳酰 CoA + CoA ⟶ 十四碳酰 CoA + 乙酰 CoA

（酰基 CoA 酰基转移酶）

总反应：$(C_{16})$ CoA + $CoA^+$ + NAD + FAD + $H_2$ ⟶ $(C_{14})$ CoA + $(C_2)$ CoA + NADH + $H^+$ + $FADH_2$

在这些反应以后，$(C_{14})$ CoA + FAD ⟶ $\triangle^2$-反-十四碳烯酰 CoA + $FADH_2$（酰基 CoA 脱氢酶）。然后，通过三羧酸循环，$C_2$ 的乙酰 CoA + 草酰乙酸 + $H_2O$ ⟶ 柠檬酸 + CoA（在柠檬酸合成酶作用下）。脂肪酸可以继续循环（β-氧化）每循环 1 次减少 2 个碳原子。产生的乙酰 CoA 进入三羧酸循环，并且可在线粒体内被氧化为二氧化碳和水。以 $C_{16}$的脂肪酸而言，最终产生 8 个乙酰脂肪酸 CoA。

1 个 16 碳脂肪单位（如软脂酸）的完全氧化和能量产生的情况如下：

（1）脂肪酸的活化（在线粒体内或外侧的 CoA 和脂肪酸间形成硫脂键），然后 CoA 的衍生物运送到在线粒体中基质的氧化部位，如十六碳的软脂酸的反应式如下：

$(C_{16})$ 软脂酸 + CoA + ATP ⟶ $(C_{16})$ 软脂酰 CoA + AMP + PPi

（长链酰基 CoA 合成酶）

ATP + AMP ⟶ 2ADP （腺苷酸激酶）

PPi + $H_2O$ ⟶ 2Pi （无机焦磷酸化酶）

总反应 1：$C_{16}$ + CoA + 2ATP + $H_2O$ ⟶ $(C_{16})$ CoA + 2ADP + 2Pi

（2）β-氧化过程

$C_{16}$CoA + CoA + $NAD^+$ + FAD + $H_2O$ ⟶ $C_{14}$-CoA + $C_2$-CoA + NADH + $H^+$ + $FADH_2$

$C_{16}$被分割成 8 个 $C_2$ 单位

总反应 2：$C_{16}$CoA + 7CoA + 7$NAD^+$ + 7FAD + 7$H_2O$ ⟶ 8$C_2$CoA + 7NADH + 7$H^+$ + 7$FADH_2$

（3）三羧酸循环

总反应 3：$8C_2CoA+24NAD^++8FAD+8GDP+8Pi+16H_2O \longrightarrow$

$16CO_2+8CoA+24NADH+24H^++8FADH_2+8GTP$

总反应 1～3：软脂酸（$C_{16}$）$+2ATP+24H_2O+31NAD^++15FAD+8GDP+6Pi \longrightarrow$

$16CO_2+2ADP+31NADH+31H^++15FADH_2+8GTP$

假如每一分子的 NADH 通过电子传递链的氧化产生 3 个 ATP，$FADH_2$ 产生 2 个 ATP，那么：

$$31NADH+31H^++93ADP+93Pi+15.5O_2 \longrightarrow 31NAD^++93ATP+124H_2O$$

$$15FADH_2+30ADP+30Pi+7.5O_2 \longrightarrow 15FAD+30ATP+45H_2O$$

全部总反应：$C_{16}+121ADP+8GDP+129Pi+23O_2 \longrightarrow 16CO_2+121ATP\text{-}8GTP+145H_2O$

绝大多数 β-氧化反应过程中的酶存在于利用脂肪酸作为能源的几个虫种的线粒体内，对于运送脂肪酸到线粒体内以肉毒碱酯的形式有 1 种明显的例外。在两种鳞翅目昆虫中，在 CoA 存在的情况下，没有加进肉毒碱。从这些蛾子中分离到的胸部肌肉的线粒体，能以接近于体内的氧化速度氧化软脂酸。肉毒碱转移酶并不存在于某些种内，至少在亚热带夜蛾（*Prodenia eridania*）及粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）中，酯酰 CoA 具有穿透线粒体膜的能力。

## 第八节 氨基酸代谢

### 1 氨基酸的合成

昆虫能从〔$^{14}C$〕葡萄糖或〔$^{14}C$〕乙酸之类的前体物质合成非必需氨基酸（如伏蝇、红头丽蝇、沙蝗、谷实夜蛾、弗吉尼亚锯角叶蜂和舌蝇等）。合成这些非必需氨基酸的代谢途径通常相当简短，而且从糖酵解或三羧酸循环的中间产物开始（表 2-11）。

**表 2-11 氨基酸合成的前体物质**

| 前 体 | 合成的氨基酸 |
|---|---|
| 丙酮酸 | 丙氨酸 |
| α-酮戊二酸 | 谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸 |
| 草酰乙酸 | 天门冬氨酸、天门冬酰胺 |
| 3-磷酸甘油酯 | 丝氨酸、甘氨酸、半胱氨酸 |

必需氨基酸一般来源于食物，某些种类来源于共生微生物的活动。Lipke 等（1965）发现，美洲大蠊将〔$^{14}C$〕葡萄糖中的同位素标记整合到必需氨基酸缬氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和苏氨酸中，他将这一结果归因于脂肪体中共生微生物的作用。Henry（1962）也发现，在德国小蠊的必需氨基酸中，整合了$^{14}C$ 标记的葡萄糖，在用抗生素处理后减少了共生物的昆虫中，这种整合幅度明显下降。另一种适应性出现在取食木材的白蚁中，这种白蚁能依赖仅含纤维素的食物而生活，在它的中肠含有共生微生物，其中一些微生物能固定空气中的氮。

脯氨酸在那些作为能源的昆虫体内，不仅有来自外部食物的，而且在脂肪体内由丙氨

酸经过下列反应合成：

(1) 丙氨酸＋α-酮戊二酸→丙酮酸＋谷氨酸　　(丙氨酸-α-酮戊二酸氨基转移酶)

(2) 丙酮酸＋$CO_2$＋NADPH＋$H^+$→L-苹果酸＋$NADP^+$　　(苹果酸酶)

(3) L-苹果酸＋$NAD^+$→草酰乙酸＋NADH＋$H^+$　　(苹果酸脱氢酶)

(4) 草酰乙酸＋乙酰CoA（从脂肪酸来）＋$H_2O$→柠檬酸＋CoA　　(柠檬酸合成酶)

(5) 柠檬酸→异柠檬酸　　(柠檬酸变构酶)

(6) 异柠檬酸＋$NAD^+$→α-酮戊二酸＋$CO_2$＋NADH＋$H^+$　　(异柠檬酸脱氢酶)

(7) 谷氨酸＋ATP＋NADH＋$H^+$→r-半醛谷氨酸＋ADP＋Pi＋$NAD^+$

(谷氨酸激酶和脱氢酶)

(8) r-半醛谷氨酸→△'-二氢吡咯-5-羧酸＋$H_2O$　　(自发的)

(9) △'—二氢吡咯-5-羧酸＋NADPH＋$H^+$→脯氨酸＋$NADP^+$

(吡咯-5-羧酸还原酶)

(10) $NADP^+$＋NADH→NADPH＋$NAD^+$　　(吡咯核苷酸转氨酶)

总方程式为：

丙氨酸＋乙酰CoA＋ATP＋NADPH＋$H^+$→脯氨酸＋CoA＋ADP＋Pi＋$NADP^+$

马铃薯甲虫（*Leptinotarsa decemlineatc*）体内某些脂肪体酶的专一活性测定证明，苹果酸酶和苹果酸脱氢酶更有可能在从丙酮酸到草酰乙酸的过程中被利用。另1种普通酶——丙酮酸羧化酶——催化下面的反应，但这种酶不是主要的。

$$丙酮酸 + CO_2 + ATP + H_2O \longrightarrow 草酰乙酸 + ADP + Pi$$

这些从脂肪体或飞行肌中得到的材料和其他信息表明，脯氨酸在马铃薯甲虫中也起重要作用。

尽管在许多昆虫的血淋巴中氨基酸的总浓度比较高，但还没有1种达到底物浓度的水平。因此，氨基酸一直被认为不能作为代谢能源。实际上，有1个例外，即脯氨酸，它来源于营养吸收以及体内合成，在两个水平上被认为是很重要的，它具有下列两种功能：

(1) 在一些昆虫体内作为丙酮酸氧化的辅助底物。

(2) 在另一些昆虫体内作为1种飞行能源的主要来源。

## 2　氨基酸的利用

在许多目的昆虫体内，脯氨酸氧化过程中的第一个酶（脯氨酸脱氢酶）在飞行肌的线粒体中以足够高的水平氧化脯氨酸的脱氢反应，但对飞行所用的能量几乎没有影响，那么脯氨酸有什么作用呢？

丽蝇飞行肌中的脯氨酸浓度在飞行开始瞬间迅速脱氢后的产物是谷氨酸。谷氨酸脱氨基成α-酮戊二酸。这是三羧酸循环的中间产物。由此使用所有其他中间产物的量都增加，导致更为有效的三羧酸循环。

在飞行开始后的几分钟内，糖酵解活动中丙酮酸积累很快，然后逐渐趋向消失。综合起来可以说明，在这些昆虫中，存在有少量的，但有作用的脯氨酸脱氢酶。脯氨酸在飞行开始时，用来起动三羧酸循环，使之达到更高的水平，以便充分地进行丙酮酸的氧化，这与从糖酵解过程中产生的丙酮酸的量相协调。

在舌蝇（*Glossina morsitans*）和其他4种甲虫体内，马铃薯甲虫（*Leptinotarsa decemlineata*）、五月鳃金龟（*Melolontha melolontha*）、*Helicopris dilloni* 和日本丽金龟（*Popillia japonica*）体内脯氨酸的水平远远高于维持功能所需要的量。实际上脯氨酸脱氢酶似乎是利用脯氨酸以维持飞行能量供给的最初的酶。在这些昆虫体内，在脯氨酸氧化过程中所涉及到的其他酶（即丙氨酸氨基转移酶及与NAD-连接的苹果酸酶）。在飞行肌的线粒体中酶的浓度也很高，而三羧酸循环的酶（如柠檬酸合成酶以及异柠檬酸脱氢酶），并不参加脯氨酸途径的反应，三羧酸循环的酶以及一些糖酵解的酶，比利用氧化糖来获得飞行能量的蝇体内的酶浓度低90%以上。

脯氨酸在飞行肌线粒体中的代谢以如下方式进行：

$$\text{脯氨酸} + FP \longrightarrow \triangle'\text{二氢吡咯-5-羧酸} + FPH_2 \qquad \text{（脯氨酸氧化酶）}$$

$$\triangle^1\text{二氢吡咯-5-羧酸} + H_2O \longrightarrow r\text{-半醛谷氨酸}$$

$$r\text{-半醛谷氨酸} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \text{谷氨酸} + NADH + H^+$$

（$\triangle^1$-二氢吡咯脱氢酶）

$$\text{谷氨酸} + \text{丙酮酸} \longrightarrow \alpha\text{-酮戊二酸} + \text{丙氨酸} \qquad \text{（丙氨酸转氨酶）}$$

$$\alpha\text{-酮戊二酸} + CoA + NAD^+ \longrightarrow \text{琥珀酰}\ CoA + CO_2 + NADH + H^+$$

（α-酮戊二酸脱氢酶复合体）

$$\text{琥珀酸}\ CoA + GDP + Pi \longrightarrow \text{琥珀酸} + CoA + GTP$$

（琥珀酰CoA合成酶）

$$\text{延胡索酸} + H_2O \longrightarrow L\text{-苹果酸} \qquad \text{（延胡索酸酶）}$$

$$L\text{-苹果酸} + NAD^+ \longrightarrow \text{丙酮酸} + NADH + H^+ + CO_2 \qquad \text{（苹果酸酶）}$$

总反应：$\text{脯氨酸} + 3NAD^+ + FAD + FP + GDP + Pi + 3H_2O \longrightarrow$

$$\text{丙氨酸} + 2CO_2 + 3NADH + 3H^+ + FADH_2 + FPH_2 + GTP$$

在呼吸链中：

$$3NADH + 3H^+ + 9ADP + 9Pi + 1.5O_2 \longrightarrow 3NAD^+ + 9ATP + 12H_2O$$

$$FADH_2 + 2ADP + 2Pi + 0.5O_2 \longrightarrow FAD + 2ATP + 3H_2O$$

$$FPH_2 + 2ADP + 2Pi + 0.5O_2 \longrightarrow FP + 2ATP + 3H_2O$$

产生的总能量：$\text{脯氨酸} + 13ADP + GDP + 14Pi + 2.5O_2 \longrightarrow$

$$\text{丙氨酸} + 2CO_2 + 13ATP + GTP + 15H_2O$$

从脯氨酸的氧化利用途径的进化来看，蛋白质是某些昆虫主要的营养来源，食物中高水平的蛋白质很有可能导致利用氨基酸产生能量。然而必须注意，即使在这些动物中，能量的最终来源仍然是贮存在脂肪内的二碳物质。

氨基酸及其衍生物在昆虫中有许多种不同的功能（表2-12）。其中最重要的功能是合成蛋白质，20种常见的氨基酸同时参与。缺少任何1种必需氨基酸即阻止蛋白质合成，导致其他氨基酸的降解。蛋白质合成所需的氨基酸来自食物中蛋白质的水解和细胞蛋白质的周转代谢。在某些昆虫中还来自于共生微生物的活动。这些来源不同的氨基酸的比例并不是蛋白质合成所需的比例，尤其是那些具有特定氨基酸组成的蛋白质大量合成时（如产丝过程中），氨基酸比例可通过体内选择性降解和非必需氨基酸的合成来调节。

表 2-12　昆虫中氨基酸的功能

| 功　能 | 有关氨基酸 |
|---|---|
| 蛋白质合成 | 全部 |
| 糖异生 | 大部分（除亮氨酸） |
| 脂肪酸合成 | 全部 |
| 核酸合成 | 天门冬氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸 |
| 氨基糖类（几丁质）合成 | 谷氨酰胺 |
| 能量代谢的氧化作用 | 全部 |
| 飞行时的脂肪降解 | 脯氨酸、丙氨酸 |
| 氮素排泄作用 | 多种氨基酸 |
| 表皮骨化 | 芳香族氨基酸 |
| 神经—肌肉的递质 | 谷氨酸 |
| 中间产物到线粒体的运输甲基化反应 | 大冬氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、(S-腺苷基甲硫氨酸) |
| 胺类合成（章鱼胺、组胺等） | 酪氨酸、组氨酸 |
| 磷酸原 | 精氨酸（磷酸化） |
| 色素合成（眼色素） | 色氨酸 |
| 血淋巴中 pH 值和渗透压的缓冲调节 | 全部 |

## 3　氨基酸的降解

氨基酸通过特定的途径转化为乙酰 CoA、丙酮酸或三羧酸循环的中间产物。表 2-13 总结了各种不同氨基酸的命运。这些资料大部分来自对脊椎动物的研究。但已有的证据表明，昆虫中氨基酸降解也按照这些路线进行。一般来说，去氨基是氨基酸降解的第一步或早期步骤，这是通过转氨基酶或氨基氧化实现的。其中氮随即以尿酸或以其他含氮排泄物的形式排出体外。某些氨基酸代谢的常见酶存在于昆虫的多种组织中（表 2-14）。

表 2-13　氨基酸降解产物

| 氨　基　酸 | 产　物 |
|---|---|
| 丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、半胱氨酸 | 丙酮酸 |
| 苏氨酸、色氨酸 | 丙酮酸、乙酰-CoA |
| 谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、组氨酸、精氨酸 | α-酮戊二酸 |
| 天门冬氨酸、天冬酰胺 | 草酰乙酸 |
| 苯丙氨酸、酪氨酸 | 延胡索酸、乙酰 CoA |
| 甲硫氨酸、缬氨酸 | 琥珀酰 CoA |
| 异亮氨酸 | 琥珀酰 CoA、乙酰 CoA |
| 亮氨酸、赖氨酸 | 乙酰 CoA |

表 2-14　昆虫中氨基酸代谢酶

| 酶 | 昆虫种类 | 组织 |
|---|---|---|
| 谷氨酸脱氢酶 | 沙蝗 | FB、FM |
| | 美洲大蠊 | FBm、FMm |
| | 麻蝇 | FMm |
| | 日本丽金龟 | FMm |
| | 马铃薯甲虫 | FB、FM |
| | 各种昆虫 | FM、N |

（续）

| 酶 | 昆虫种类 | 组织 |
|---|---|---|
| 天门冬氨酸转氨酶 | 沙蝗 | FB、FM、MT |
| | 飞蝗 | FB、FM、MT |
| | 麻蝇 | FMm |
| | 美洲大蠊 | FBc、FMm |
| | 各种昆虫 | FM、N |
| 丙氨酸转氨酶 | 沙蝗 | FB、FM、MT、G |
| | 美洲大蠊 | FBc、FMm |
| | 果蝇 | FB |
| | 黑果蝇 | FM |
| | 日本丽金龟 | FMm |
| | 马铃薯甲虫 | FM、FB |
| | 各种昆虫 | FM、N |
| 鸟氨酸转氨酶 | 巨尾阿丽蝇 | FB、FM、MT、G |
| 谷氨酰胺合成酶 | 飞蝗 | G |
| | 麻蝇 | FMc |
| 谷氨酸脱羧酶 | 麻蝇 | FMm |

注：FM. 飞行肌 FB. 脂肪体 MT. 马氏管 G. 中肠 N. 神经组织 m. 线粒体 c. 胞质

在飞蝗和沙蝗飞行过程中氨基酸浓度的变化表明，许多种氨基酸（尤其是脯氨酸）可以作为能源。在舌蝇和马铃薯甲虫的飞行初期，血淋巴中的脯氨酸是主要的能源物质。但随后继续飞行时，脯氨酸的作用是通过脯氨酸—丙氨酸循环将来自脂肪体的脂类二碳单位（$C_2$）转运到飞行肌。在马铃薯甲虫脂肪体中，脯氨酸合成是由来自心侧体的激素调控的。

在饥饿期间，氨基酸降解用于糖异生有重要的生理意义。在沙蝗饥饿时期，血淋巴的氨基酸含量是对照值的 2 倍以上，而蛋白质含量则降至对照值的 1/2 以下。这意味着血淋巴的蛋白质被转变成氨基酸。在飞蝗饥饿期间，其肌肉中蛋白质也会被降解。

# 第九节 其他代谢

## 1 糖类的磷酸戊糖途径

许多昆虫脂肪体内与糖代谢有关的酶已经有过很多研究。但在 20 世纪 80 年代，仍然无人系统地说明脂肪体内所有糖酵解酶的位置和专一活性。根据几个酶的分析，一般认为脂肪体内糖酵解过程与肌肉中的相似。利用葡萄糖的第二途径也存在于脂肪体中，它与用于脂类合成的还原性 $NADP^+$ 及用于核酸合成的戊糖的关系紧密。所谓的“磷酸戊糖途径”或者“戊糖支路”，在昆虫中 20 世纪 60 年代已被发现，在整体昆虫及脂体的粗提液中，它可以部分地表现出来。这条途径的重要性就在于它的代谢功能。在昆虫体内与其他动物组织中反应过程是一致的：

6,6-磷酸葡糖 + 6$NADP^+$ ⟶ 6,6-磷酸葡糖醛 + 6NADPH + $H^+$（6-磷酸葡萄糖脱氢酶）

6,6-磷酸葡醛 + 6$H_2O$ ⟶ 6,6-磷酸葡萄糖内脂 （内酯酶）

6,6-磷酸葡糖内脂 + 6NADP$^+$ ⟶ 6,5-磷酸-D-核酮糖 + $CO_2$ + 6NADPH + 6H$^+$ （6-磷酸葡萄糖内酯脱氢酶）

2,5-磷酸-D-核酮糖 ⟶ 2D 5-磷酸核糖 （磷酸核糖异构酶）

2,5-磷酸-D-核酮糖 ⟶ 4,5-磷酸-D-木酮糖 （差向异构酶）

2,5-磷酸-核糖 + 2,5-磷酸 D-木酮糖 ⟶ 2,7-磷酸-D-景天庚酮糖 + 2,3-磷酸-D-甘油醛 （转酮糖酶）

2,7-磷酸-D-景天庚酮糖 + 2,3-磷酸-D-甘油醛 ⟶ 2,6-磷酸-D-果糖 + 2,4-磷酸-D-赤藓糖 （转醛糖酶）

2,5-磷酸-木酮糖 + 2,4-磷酸-D-赤藓糖 ⟶ 2,6-磷酸-D-果糖 + 2，3 磷酸-D-甘油醛 （转酮糖酶）

3 磷酸-D-甘油醛 ⟶ 磷酸二羟丙酮 （磷酸丙糖异构酶）

3 磷酸-D-甘油醛 + 磷酸二羟丙酮 ⟶ 1,6 一二磷酸果糖 （醛缩酶）

1,6 -二磷酸果糖 ⟶ 6-磷酸果糖 + Pi （已糖二磷酸酶）

5,6-磷酸果糖 ⟶ 5,6-磷酸葡萄糖 （糖酸葡萄糖异构酶）

总反应：5,6-磷酸葡萄糖 + 12NADP$^+$ + 6$H_2O$ ⟶

5,6-磷酸葡糖 + 6$CO_2$ + 12NADPH + 12H$^+$ + Pi

这条途径开辟了还原性吡啶核苷酸及戊糖磷酸的来源。

美洲蜚蠊脂肪体内的可溶性糖代谢酶类的研究有助于解释一些现象。这种昆虫体内，至少有6-磷酸葡糖到三碳磷酸的酵解转化有关的酶（即磷酸葡萄糖酶、磷酸果糖激酶及醛缩酶），与酵解过程中的其他酶相比其活性很低，而且磷酸戊糖途径的另1种酶——磷酸葡萄糖异构酶的活性很高。因为磷酸戊糖途径的主要作用是供应脂类合成的还原性NADP$^+$，并且在脂肪体内糖酵解过程受到限制。在蜚蠊体内现已证明合成是脂肪体的主要代谢内容。

在许多昆虫体内已经检测到，磷酸戊糖途径对于葡萄糖的整个分解起重要作用。通过代谢来的 $C_6$ 位上的二氧化碳与$^{14}$C-标记的葡萄糖的 $C_1$ 的二氧化碳的比例来确定这条途径的参加与否。前面讲过的酵解途径，当丙酮酸被转为乙酰 CoA 时，二氧化碳首先从葡萄糖中分解出来（$C_3$-$C_4$），然后 $C_2$-$C_5$ 及 $C_1$-$C_6$ 在三羧酸循环中被氧化，而磷酸戊糖途径中的二氧化碳的产生全部来源于6-磷酸葡萄糖酸的脱羧。因此，$C_6$:$C_1$ 比例小于1，说明戊糖途径被利用了，比例越小，说明利用得越多，这一直是确定昆虫体内两种代谢途径比例的最有效的方法。这些实验的结果说明，在不同的昆虫体内，磷酸戊糖利用的比例有很大的差异。从雌性美洲蜚蠊的3%（在雄性中占21%）到1种双带蚱蜢（*Melanoplus bivittatus*）体内的38%。这种蚱蜢利用脂类作飞行的能源。有趣的是有些双翅目成虫如 *Phormia terranovae*，对低温忍耐性强，是由于低温时磷酸戊糖途径的活动加强，但它的生物学意义并不十分清楚。

## 2 糖异生作用

在动物体内糖类耗尽的情况下，通过糖异生作用，能够转变氨基酸为丙酮酸或草酰乙

酸，或通过酯酶的作用释放游离的甘油酯，并通过一般的糖解来逆转，从而为昆虫供糖。到目前为止，所研究过的昆虫，凡是能够通过氧化反应转变为乙酰 CoA 的脂肪酸和氨基酸的，都不能以糖的形式贮存。因为丙酮酸脱氢酶的不可逆性以及缺少乙醛酸循环。糖酵解中释放能量的反应是不可逆的。如：

（1）丙酮酸激酶催化的反应

磷酸烯醇式丙酮酸 + ADP ⟶ 丙酮酸 + ATP

（2）6-磷酸果糖激酶催化的反应

6-磷酸-D-果糖 + ATP ⟶ 1，6-二磷酸-D-果糖 + ADP

这些反应的底物必须通过间接的方法再参加反应。

反应（1）的底物是磷酸烯醇式丙酮酸，可以通过细胞质中草酰乙酸的反应得到，磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶具有催化作用。

草酰乙酸 + GTP ⟶ 磷酸烯醇式丙酮酸 + $CO_2$ + GDP

这种酶存在于许多昆虫的脂肪体及肌肉中。

草酰乙酸是在线粒体内三羧酸循环中的成分之一，直接通过循环中的丙酮酸经过氧化反应得到，负责丙酮酸到草酰乙酸的是丙酮酸羧化酶，存在于许多昆虫的线粒体上。

丙酮酸 + $CO_2$ + ATP + $H_2O$ ⟶ 草酰乙酸 + ADP + Pi

但是线粒体膜对草酰乙酸是不通透的，可以通过苹果酸进入线粒体内，在细胞质中的催化草酰乙酸的脱氢酶重新使它氧化为草酰乙酸。

草酰乙酸 + NADH + $H^+$ ⟶ L-苹果酸 + $NAD^+$　　（线粒体中苹果酸脱氢酶）

L-苹果酸 + $NAD^+$ ⟶ 草酰乙酸 + NADH + $H^+$　　（细胞质中苹果酸脱氢酶）

总反应：丙酮酸（线粒体中）+ ATP + GTP + $H_2O$ ⟶ 磷酸烯醇式丙酮酸（细胞质中）+ ADP + GDP + Pi

反应 2 的底物是 6-磷酸果糖，可以通过 1，6-二磷酸果糖的水解得到，1，6-二磷酸-D-果糖水解为 6-磷酸-D-果糖 + Pi，果糖-1，6-二磷酸酶催化这个反应，它普遍存在于昆虫的脂肪体和肌肉中。该酶除了在糖异生中的作用以外，在一些熊蜂的胸部，这个酶还涉及到产生热量的代谢循环。在这些昆虫中，寒冷的气候下，必须把肌肉温度提高，线粒体的酶能以足够的活力表现其功能，供应能量使肌肉进行有效的收缩，甚至飞行。这些热量是通过由 6-磷酸果糖激酶和果糖二磷酸酶所催化的反应中得到的。

6-磷酸果糖 + ATP ⟶ 1，6 二磷酸果糖 + ADP　　（激酶）

1，6 二磷酸果糖 ⟶ 6-磷酸果糖 + Pi　　（磷酸酶）

在这个循环中 ATP 被水解，能量以热的形式释放。当熊蜂飞行时，胸部的温度的调节无需这些反应。在静止时这个循环被活化，肌肉温度高于周围温度。但蜜蜂没有这种能力。

## 3 脂肪体内由糖产生甘油

许多昆虫对于低温的反应是通过提高血液中的防寒物质的水平，如糖（双翅目昆虫 *Eurosta solidagensis* 的海藻糖）、糖醇（例如鞘翅目昆虫 *Upis ceramboides* 的山梨醇与甘露醇）或者甘油（很多鞘翅目成虫和鳞翅目滞育蛹）。这种保护作用的机制是降低血液的凝

固点以及减少血液和组织内冰晶的大小和形成的速度。不同的化合物间的机制可能不同。

控制上述化合物代谢变化的因子都还不太清楚。但是，已经知道甘油是在脂肪体中糖的磷酸化过程中，通过糖酵解途径产生的，磷酸葡糖成为磷酸二羟丙酮，然后成为3-磷酸-L-甘油，后者需通过细胞质中的3-磷酸甘油脱氢酶的催化。3-磷酸甘油通过水解反应，在可溶性的3-磷酸甘油磷酸酶存在的情况下成为游离甘油和磷酸。

3-磷酸-L-甘油⟶甘油 + Pi

在惜古比天蚕蛾幼虫的脂肪体的粗匀浆中，磷酸化酶激酶与双翅目昆虫飞行肌的这种酶形成对照，当与ATP一起时，这种酶被活化。因此，这种酶似乎也像在哺乳动物肝细胞中的那样，它能活化糖磷酸化酶，本身在cAMP被加到整个脂肪体的匀浆液时被活化。这说明蜚蠊脂肪体中也像惜古比天蚕蛾中的那样，有严格控制糖原降解的系统。

## 4 嘌呤和嘧啶的合成

嘌呤和嘧啶是所有生物合成核酸和核苷酸类辅酶所必需的。此外、昆虫通常以尿酸（或嘌呤）和其他与尿酸有关的生化产物形式排出大部分含氮废物。

合成尿酸和其他嘌呤类的途径首先是根据在鸟类中所做的实验提出来的。现在有越来越多的证据表明，这一途径或与之相类似的途径也在昆虫的嘌呤合成中起作用。

昆虫中存在嘌呤合成途径的证据来自放射性化合物的掺入试验。例如，McEnroe和Forgash（1975）研究表明，〔$^{14}$C〕甲酸盐掺入尿酸的2-位和8-位碳上（美洲大蠊）。Barrett和Friend（1970）利用1-〔$^{14}$C〕甘氨酸、2-〔$^{14}$C〕甘氨酸和〔$^{14}$C〕甲酸盐确定了尿酸的2-、4-、5-和8-位碳原子的来源。这些结果与鸟类中的合成途径一致。但昆虫中合成尿酸的部位是脂肪体。

嘧啶的合成也是从简单的前体物质开始的，通过若干步反应生成UMP。而且这些途径的原始证据也来自于脊椎动物和微生物。在昆虫中也利用同样的合成途径。特别是合成UMP的全部酶都发现于果蝇中。催化前三步反应的酶（羧酸合成酶、天冬氨酸转羧基酶和二氢乌氨酸酶）是一类胞质酶复合体，且都被编码于同一位点。该位点的突变体缺少这3种酶。营养研究表明，某些昆虫种类（尤其是某些双翅目昆虫）只有有限地合成嘌呤和嘧啶的能力。Brookes和Fraenkel（1956）发现，家蝇幼虫最快生长时必需供给RNA，而且腺嘌呤和鸟嘌呤组分看来是最重要的。与此相类似，在果蝇和螺旋蝇中，最适宜的生长也需要核酸。Dadd（1979）已证实关于尖音库蚊需要核酸胸腺嘧啶是其适宜的生长所必需的，而嘧啶核苷酸也是生长所必不可少的。

# 第三章 昆虫的表皮化学

昆虫表皮是皮细胞分泌的躯壳覆盖物，起着保护和支持虫体的作用，一般分为上表皮和原表皮。上表皮由蛋白质和蜡质构成，原表皮以蛋白质作为基质，包埋着众多的几丁质微丝，两者之间形成复杂的结构。它们的理化性质在不同部位很不相同，而且处于不断的变化之中，最明显的差异是原表皮能分化成骨化的外表皮和不骨化的内表皮。1982 年 Andersen 和 Roepstorff 提出了外表皮骨化作用的新概念，他把表皮区分为蜕皮前形成的和蜕皮后形成的两部分。前者是骨化的，后者不骨化。对表皮蛋白质理化性质有了新的区分标准。随着蛋白质研究的深入，对几丁质蛋白交联以及骨化过程中鞣化剂的作用和蛋白质结合方法的阐明，大大丰富了表皮化学的知识领域。本章重点叙述表皮中蛋白质种类以及与几丁质之间的相互作用、几丁质的合成与降解，以及蛋白质骨化和降解。

## 第一节 几丁质

几丁质（chitin）是纤维素的衍生物，与纤维素和胶原一样，成为生物体三大支持系统之一（表 3-1），通常由 2 种不同的单体联合而成，即 N-乙酰氨基葡糖和氨基葡糖。它们之间比例一般为 9:1，但也有 1.45:1 的（Neville，1975）。生物合成几丁质最早发现于低等生物中。原生动物、真菌和大多数原口无脊椎动物都能产生几丁质。

**表 3-1 生物支持系统中 3 种主要大分子物质**

| 类别 | 主要化学结构 | 化学键类型 | 参与的复合物 | 功能 | 分布 |
|---|---|---|---|---|---|
| 几丁质 | 乙酰氨基葡糖-氨基葡糖 | β-1，4-糖苷键 | 蛋白（真菌多糖残基） | 非结缔组织 | 真菌、硅藻、动物 |
| 纤维素 | 葡萄糖 | β-1，4-糖苷键 | 木素 | 非结缔组织 | 植物、被囊动物 |
| 胶原 | 氨基酸 | 肽键 | 多糖残基 | 结缔组织 | 动物 |

## 1 晶体形式及结构

几丁质的晶体形式是异质性的，已知的形式有 α-、β-和 γ-3 种。

α-几丁质是几丁质晶型最普遍的一种，其详细结构是由 Carlstrom 提出的（1957）。他

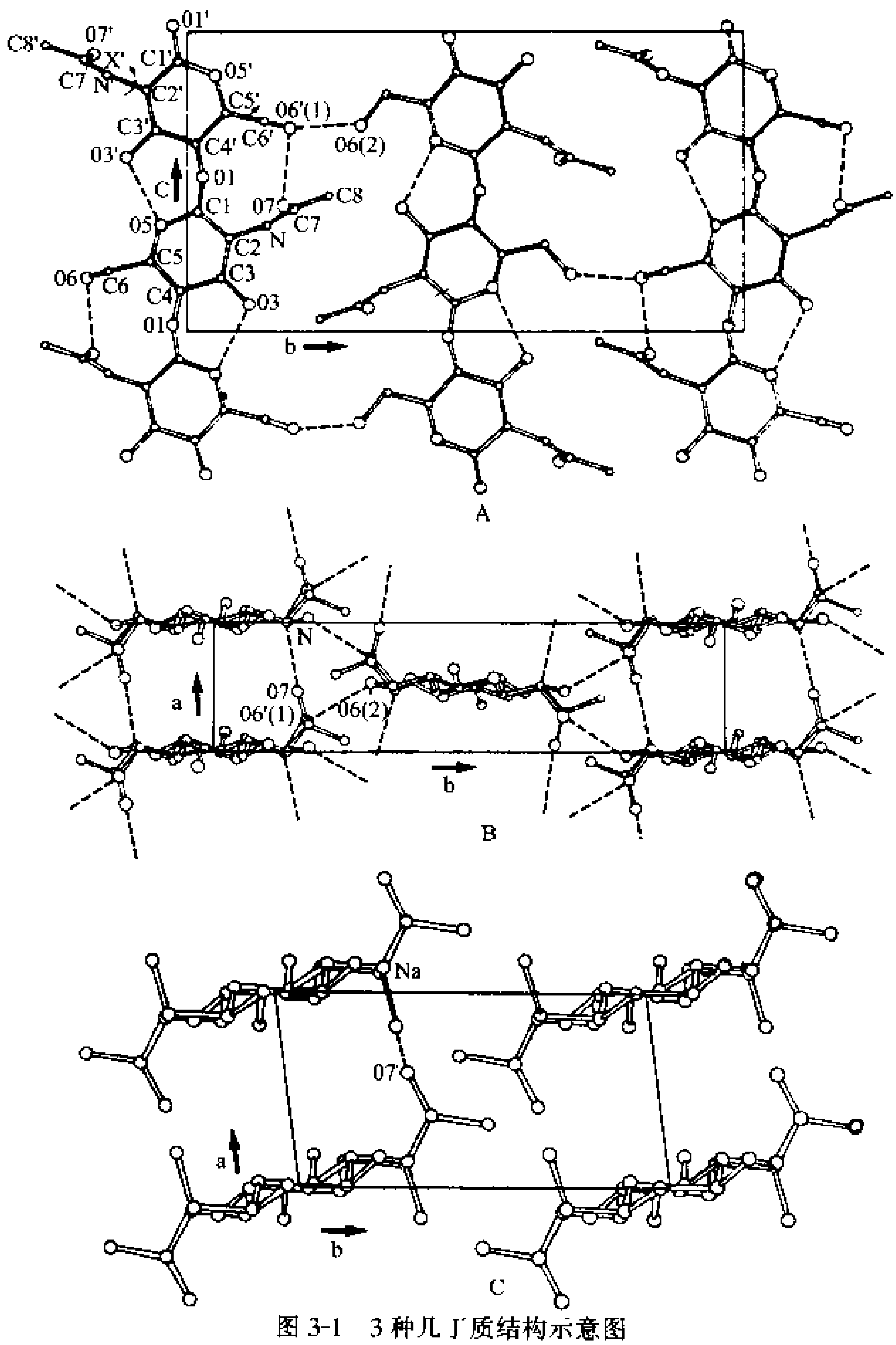


图 3-1 3 种几丁质结构示意图

A. α 几丁质 x' 和 x 示侧链旋转位置，左上角 $CH_2OH$ 中形成 O6'（1）-H…O7 分子间结合和中心链中 $CH_2OH$ 形成 O6（2）-H…O6 分子间结合。

B. α-几丁质分子间的 c7＝O7…H－N 和 O6（2）-H…O6' 结合。

C. 无水 β-几丁质分子间的 C7－O7…H-N 结合

（仿 Blackwell 等，1978）

证实了α-几丁质具有正交单晶格结构，并确定了晶格的大小和基团的空间对称性（相邻链是反向平行的（图3-1)。

α-几丁质的晶格常数是：a轴474nm、b轴1 836nm、c轴（纤丝轴）1 032nm。单晶格含有两条反向平行链组成双糖片段。分子内有氢键（O3'-H…O5)，相继通过C=O…H-N链连接，从而沿a轴形成片层。在单晶格结构内的两条链的各方向的$CH_2OH$边链采用极不相同的构型。1条链中$CH_2OH$基团与下一个残基的羰基形成分子内氢键(O6-H…O7')，另1条链的$CH_2OH$基团形成分子间和片层间氢键（O6-H……O7')。所有的羟基都以氢键结合，因此α-几丁质对水合物的形成具有抗水性，在水中不膨胀。此外酰胺基团也被氢键结合。

Lotmar和Picken（1950）在枪乌贼（*Loligo*）羽状壳的衍射研究中，首先把β-几丁质同α-几丁质区分开来。β-几丁质在昆虫中很少，仅见于少数甲虫中，球象甲的茧袋中有β-几丁质，其单斜单晶格的c轴为1 038pm，a轴为485pm，B轴为926pm。因单晶格只含1种重复的双糖，平行方式排列的链正好与α-几丁质相反。由于β-几丁质缺乏片层间氢键，因而大多能形成水合物。

γ-几丁质是Rudall研究枪乌贼的胃时发现和定性的。γ-几丁质比β-几丁质更为少见。在跳甲、裸蛛甲、蛛甲的茧袋和折翅蠊、沙漠蝗、天蚕蛾和长须叶蜂的围食膜中有少量存在。γ-几丁质晶格常数是c轴约1 030pm，a轴约470pm，b轴约2 900pm。和β-几丁质一样，γ-几丁质在溶剂作用时能明显变形。

以微纤丝形式存在于昆虫中的3种几丁质晶型虽然结晶形式不同，但都属于黏弹性多聚体，这些几丁质的宏观样品因增加负荷而变形时，它们的机械特性（如柔软性、强度和延展性）在同一晶型内或不同晶型间都有差异（图3-2)。

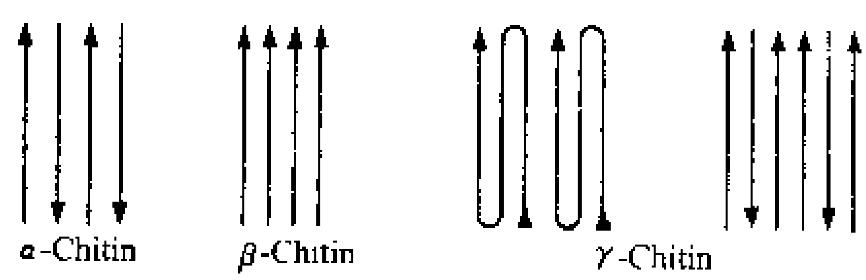



图3-2 几丁质3种晶型几丁质链的排列方式

（仿Rudall，1963）

几丁质不同晶型的机械特性，最终是由微晶结构和蛋白质与其交联方式决定的。α-几丁质与β-和γ-几丁质不同。由于它具有链间键合的特点，通过链的滑动能改变黏弹性，而β-和γ-几丁质黏弹性的变化主要靠分子构形的改变。

在昆虫茧或围食膜中的几丁质晶体大多形成直径约3nm的微纤丝的聚集体，同时与蛋白质基质相联系。骨片中的α-几丁质，在任何一个平面上约有18～21条穿过微晶的链，即每个片层具有3组由6～7条微纤丝组成的单链，几丁质微纤丝的直径不受皮细胞的直接控制。β-和γ-几丁质可被诱导向α-几丁质类型转化，反之则不行。

## 2 几丁在表皮中的构型

原表皮中几丁以微纤丝的形式包埋在表皮蛋白中，它的三维排列方式如何，长期以来一直是广泛争论的问题，关键在于怎样解释电镜下观察到的表皮中几丁纤丝所呈现的类抛物线构型。对这些构型的出现，Bouligand提出了螺旋模型。在该模型中表皮内的几丁质微纤丝存在于薄片中，其所有微纤丝彼此平行，并且常与表皮的表面平行，相邻片层之间

以一定的角度旋转，并且总是保持相同的旋转方向，旋转180°后，若干薄片成为1个片层。这样，各层次中的微纤丝从横切面看不是平直而是弯曲的。然而，超薄切片时表皮的倾斜度不同，很容易导致片层厚度的变化，因此，微纤丝的抛物线构型也可能是光学上的假象。

Weis-Fogh（1970）提出了另一模型。在该模型中微纤丝被连续地分泌到先前形成的微纤丝薄片上，致使微纤丝在片层内逐渐地垂直变位，这便是螺旋地毯式模型(screw—carpet model)的观点。从几何学角度来看，两个模型都是合理的，然而不能说在所有情况下都很正确。例如（1）两个模型都排除了存在有不连续片层的可能，大蠊和青蟹中都存在这种片层；（2）在表皮样品作为截顶的锥形中，至少在某一角有分离的横向片层，但实际上恰恰相反；（3）螺旋体模型不能解释垂直微纤丝的发生；（4）两者都不能解释垂直于表皮的环状型式。

所有几丁质片层的构型都是微纤丝组成的层次，并以螺旋状排列在蛋白质基质中，邻近的层次以单向定位的方式形成1个选择定向层，两者可以单独发生，也可连续变化。换言之，微纤丝的构型是包埋在蛋白质基质内的1种可变织物构造（与玻璃纤维/树脂复合物排列相似）或者微纤丝构成的片层被不连续的基质（蛋白质）完全隔离。这些模型虽很有启发性，然而均未得到完全的证实。

## 3 几丁与蛋白形成的复合体

几丁质和蛋白质形成的复合物由Blackwell和Weih 1980年在研究姬蜂（*Megarhyssa*）产卵器X-衍射的基础上提出了1个模型，由15～30条几丁质链组成的超螺旋，以3.06 nm的微纤丝为核心，外围是蛋白质鞘，总的直径为7.25nm，蛋白质与几丁以6∶1螺旋方式包围在几丁质外周，构成1个亚单位（图3-3），即6个蛋白分子在几丁微纤丝外旋转一圈，每组几丁-蛋白纤丝以六边形柱状排列，长15.3nm为1个纤丝重复单位，相当于6个N-乙酰氨基葡糖的长度。姬蜂产卵器是高度定向的结构，在该结构中，几丁质和蛋白质组分在分子水平上都是高度定向的，使X-衍射图分辨得很清楚。几丁-蛋白复合体在表皮中可能不像产卵器官中那样有规则。表皮蛋白种类随着表皮的类型和年龄的不同而异。应用X-衍射分析技术和其他的研究方法只证实了蛋白质是绕在几丁质周围的。

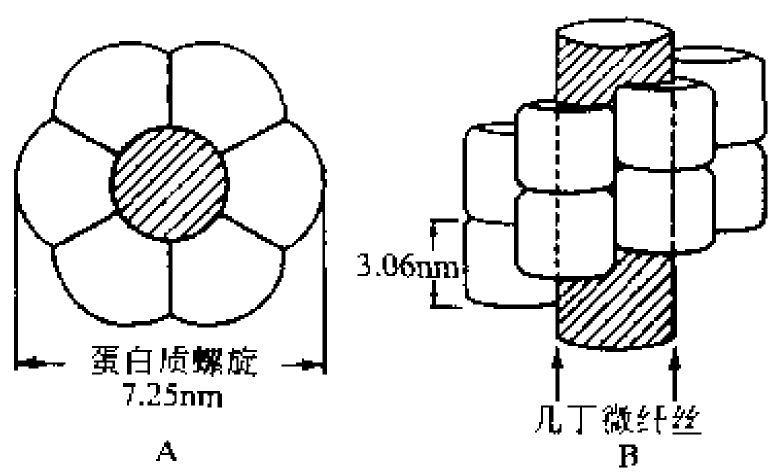



图3-3 几丁蛋白复合体结构示意图
A. 横切面示几丁微纤丝外的蛋白亚单位
B. 示纵切面中蛋白质球形排列
（仿Black well和Weih，1980）

## 4 分解几丁-蛋白复合体的酶

昆虫在蜕皮期期间对表皮的消化，就是对几丁-蛋白复合体的降解。在这个过程开始时，首先要使几丁细丝外围的蛋白质与之分离，然后几丁质才能暴露出来，在几丁酶的作用下进行降解。Marcu和Locke（1998）从大芭蕉卷叶弄蝶5龄幼虫到预蛹表皮中纯化得

到1种$22\times10^3u$的酰氨酶，具有降解蛋白-几丁复合体的功能，揭示了表皮消化过程中重要的一步。

近年来先后从家蚕、丽蝇和烟草天蛾的表皮中分离到很多具有酶活性的蛋白。在Swiss-Prot数据库中除记录了43种表皮结构蛋白以外，同时记录了11种有酶活性的蛋白(表3-2)。这些蛋白大多属几丁酶或蛋白酶，不但与表皮的降解有关，并且与表皮的骨化、黑色素的形成有关。

**表3-2 表皮中具有酶活性的蛋白组分**

| 蛋白种类 | 分子量 ($1\times10^3u$) | 信号肽 | 登记号 | 蛋白主题 | 3种氨基酸的分子含量（%） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 半胱氨酸 | 甲硫氨酸 | 丙氨酸 |
| 家蚕 BM-CECB | 6.8 | − | P04142 | 酰胺化 | 0 | 4.8 | 12.9 |
| 红头丽蝇 | | | | | | | |
| CV-ARY1 | 92.3 | | P28513 | | 0.3 | 4.3 | 2.4 |
| 黄猩猩果蝇 | | | | | | | |
| DM-DOXA2 | 56.0 | + | P25161 | | 0.4 | 1.6 | 10.9 |
| DM-L2AM | 50.9 | + | P18486 | | 2.5 | 2.5 | 10.3 |
| DM-AML1 | 57.9 | + | P07191 | | 0.3 | 2.5 | 5.3 |
| DM-MAL2 | 60.5 | + | P07190 | | 0.7 | 2.1 | 5.3 |
| DM-MAL3 | 57.5 | + | P07192 | | 0.7 | 1.9 | 6.9 |
| DM-YELL | 60.5 | + | P09957 | | 1.1 | 1.2 | 6.2 |
| 烟草天蛾 | | | | | | | |
| MS-ARYA | 83.8 | − | P14296 | | 0 | 2.4 | 4.5 |
| MS-ARYB | 83.8 | | P14297 | | 0 | 1.9 | 5.5 |
| MS-CHIT | 61.1 | − | 936362 | 几丁酶族18 | 2.4 | 1.8 | 5.8 |
| 大芭蕉卷叶弄蝶 | | | | | | | |
| CE-CP22 | 22.0 | − | AF03544GB | 酰胺化 | 1.7 | 2.3 | 3.5 |

注：蛋白质中氨基酸序列来自基因库，其余来自Swiss-Prot数据库。

Marcu和Locke（1995）从大芭蕉卷叶弄蝶（Calpodes）蜕皮期的表皮中分离到具降解酶活性的CECP22，并获得多克隆抗体。研究证实是1种分解几丁纤丝外层蛋白的酰胺酶。CECP22开始出现于幼虫和蛹蜕皮期，不存在于蜕皮间期，至成虫羽化后消失。在化蛹前8h的蜕皮液中达到峰值，利用抗体筛选1个皮细胞cDNA文库，克隆长680bp长，克隆5’-3’端长度83bp，有1个开放阅读框架，分子量$21.3\times10^3u$，24核苷酸处有1个ATG起始密码子。CECP22由皮细胞分泌或血淋巴传运（Sasset al，1993，Locke，1998），在表皮降解时运送到表皮片层中，在初期是无活性的，表皮降解之前在蜕皮液中被活化，和其他生物的酰胺化酶有相似的功能，有一个酰胺化作用位点（Prigg et al，1997），与噬菌体T3和T7的溶菌酶有相似的序列。无活性的前体需经限制性水解而出现活性。在蜕皮液中与蜕皮液滴无关，未活化的前体C-末端有一个酰胺化的焦点与飞蝗糖蛋白LM-Abd-4A和惜古比天蚕蛾BM-CECB相似，它们的蛋白水解活性受神经肽或肽类激素的调控。

CECP22的功能可从氨基酸序列与T7和T3溶菌酶的相似性中得到启示。T7和T3是一类水解细胞壁中胨聚糖（peptoglycan）的几丁酶。这类胨聚糖有N-乙酰胞壁酸和N-乙酰葡萄糖胺与L-丙氨酸之间形成酰胺键，从而成为溶菌酶的基质。昆虫几丁-蛋白键以

L-丙氨酸与N-乙酰葡萄糖胺结合的方式，与此很相似，由此形成几丁微纤丝平行排列的结构。CECP22分解其中特殊的分子键，使几丁微纤丝脱去外层蛋白质的包围，暴露出几丁质，使它能接受几丁酶作用而降解。脱离几丁微丝的肽，则进一步被蛋白酶消化。Samuels等（1993）认为，烟草天蛾表皮分解开始于蜕皮液中蛋白酶，通过对它特异性蛋白的消化来完成。由此得出结论的CECP22属于表皮降解酶中的酰胺酶，不同于一般的蛋白酶或几丁酶。

几丁-蛋白复合体中CECP22酶解产物为几丁酶和蛋白酶提供了基质，因此CECP22的活化成为表皮分解的第一步。对分解N-乙酰胞壁胺L-丙氨酸键的细菌来说，它是1种蛋白内酶。比较105种已知的酰胺酶，CECP22的氨基酸序列只与噬菌体酰胺酶相似，而且两者的催化机制可能不同。T7酰胺酶与锌结合，催化位点中有2个氨基酸（Cheng，et al，1994），但CECP22结构中未发现这些结构。另外，CECP22在昆虫的不同发育阶段是由同一基因表达的，在变态过程中由皮细胞的某种特异性时序开关调控并开动基因的启动子（Binger and Willis，1994）。

## 5 几丁质的合成

通过电镜和放射化学的研究表明，几丁质作为皮细胞的产物以单体的形式分泌出来，附着于细胞外原生质膜上。几丁质合成酶负责几丁质的聚合作用和微纤丝的精细构造。几丁质合成酶是在皮细胞的内质网中以酶原形式产生的，并被几丁小体（chitosomes）转送到膜上，被蛋白酶类所活化。在几丁质合成酶的催化下，乙酰氨基葡糖聚合成多聚-N-乙酰氨基葡糖，进而结晶并成束地融合进较大的微纤丝中，在表皮结构中形成几丁质纤丝。合成途径如图3-4。

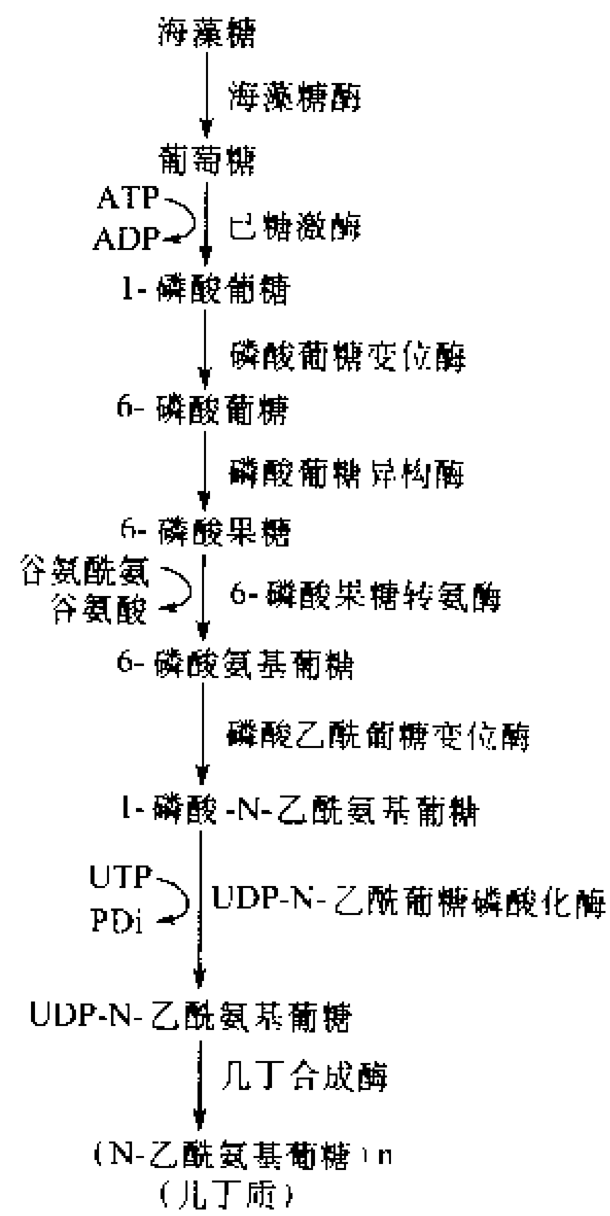



图3-4 几丁质合成途径与合成酶
（仿Kramer等，1985）

昆虫在蜕皮期间，通过酶的降解后吸回内表皮中的几丁质，一部分可在沉积新表皮时加以再利用。分解几丁质的酶主要是"几丁酶"和"几丁二糖酶"。它们同若干其他酶组成混杂物。在表皮中酶原受到某种依赖于钙离子的蜕皮液因子的活化，在几丁质分子上存在着乙酰化部位也能受酶的降解；有几种不同的酶能降解几丁质的缩醛键，另一些酶则破坏几丁质和蛋白质复合体。

# 第二节 几丁酶

几丁酶是对几丁质起专一性水解的酶，同时也能水解相关的聚合物。酶的裂解常发生在整个聚合物的内部区域。被几丁酶催化的最终产物是可溶的、小分子量N-乙酰氨基葡

糖（GlcNAc）的低聚物（如壳四糖、壳三糖和壳二糖），以最小的低聚糖为主。这些低聚糖然后成为另外一类几丁水解酶（β-N-乙酰氨基葡糖酶）的底物，这种酶连续从底物的非还原端裂解 GlcNAc 单元。以上 2 类酶存在于含有几丁质的有机体（如昆虫、甲壳动物、酵母和其他真菌类）中，甚至在不含几丁质的有机体（如细菌、植物和脊椎动物）中也有存在。

在细菌中，几丁酶可能参与消化，提供含营养的大分子物质。在植物中，它们有可能起防卫蛋白的作用，以对付病原物和有害生物。在脊椎动物中，类几丁酶的作用还不清楚，可能具有抗真菌和线虫侵染的作用。

在无脊椎动物中，几丁酶参与表皮的更新、活化和营养物质的消化。在蜕皮液、毒腺和几种昆虫的中肠中都发现有几丁酶，但仅前面所述的 2 类几丁酶得到鉴定（Terra and Ferreira，1994；Reynolds and Samuels，1996；Terra et al.，1996）。昆虫周期性的蜕去旧表皮，连续或周期性的脱掉旧围食膜和合成新围食膜。这些过程受到蜕皮液中几丁酶的调节。蜕皮液积累在旧表皮和新表皮层之间以及消化道组织中。水解产物 GlcNAc 被重新用来合成新的表皮。许多幼虫会取食并消化旧表皮或“蜕”，其成分也会再被利用。这些行为与几丁酶在消化道内表达的时间相吻合。很明显，在消化道中的几丁酶除了分解肠内和围食膜的几丁质外，还具有消化功能。在一些有毒的膜翅目昆虫中，几丁酶可能具加速有毒物质从原发地扩散的作用。在微丝蚴侵染时，几丁酶通过分解线虫或寄主昆虫的几丁质结构而促进侵染。对于真菌类来说，几丁酶明显有利于有机物质的降解和流动，还可能具有抑制竞争对手生长的作用。在酵母中，几丁酶对细胞的分离起重要作用（Sakuda et al.，1990；Kuranda and Robbins，1991）。

## 1 酶的生化与分子生物学

在烟草天蛾（*Manduca sexta*）和家蚕（*Bombyx mori*）的蜕皮液和体壁中，已分离和纯化了几丁酶，在内寄生黄蜂（*Chelonus*）的毒腺中也分离出了几丁酶（Kirshnan et al.，1994）。这些昆虫和其他几种几丁酶的化学、物理及动力学特性已有许多研究报告。昆虫几丁酶的分子量在（40～85）$\times 10^3$u 之间，明显大于植物几丁酶〔（25～40）$\times 10^3$u〕和细菌几丁酶〔（20～60）$\times 10^3$u〕的分子量。在 pH4～8 之间有活性，等电点为 pH5～7。昆虫几丁酶在昆虫细胞株系或转基因植物中，表达这些酶的 cDNAs 已经得到提取和纯化（Krishnam et al.，1995；Wang et al，1996）。除来自转基因植物中的蛋白质外，几丁酶和蜕皮液酶被广泛的糖基化。在蜕皮液和转基因植物中出现的一些小型酶很可能是大型酶水解后所产生的。

### 1.1 几丁酶的 cDNA 克隆

Kramer（1993）首次从烟草天蛾中分离出了编码昆虫几丁酶的 cDNA，并进行了分析。全基因至少有 11 个外显子，长约 11kb，以单独编码信号肽。以后，又报道了 2 种其他昆虫（Kirshnan et al.，1994;）和 2 种线虫几丁水解酶的 cDNAs 克隆（Huber et al.，1991；Fuhrman，1995；Adam et al.，1996）。作为所期望的分泌蛋白质，概念蛋白编码 19～22 氨基酸的疏水前导肽，接着是与几丁酶有关的成熟 N-端的相应序列。烟草天蛾几

丁酶成熟的概念蛋白有 554 个氨基酸，分子量为 $62\times10^3$u；*Brugia malayi* 的几丁酶共含 482 个氨基酸，分子量为 $55\times10^3$u；*Clelonusde* 的毒蛋白共含 464 个氨基酸，分子量为 $52\times10^3$u。因糖基化作用，导致烟草天蛾和线虫几丁酶的分子量为（70～85）$\times10^3$u，但毒蛋白的糖基化不明显。

### 1.2 几丁酶的结构

按照氨基酸序列、结构相似性与结构和进化关系进行蛋白质分类。烟草天蛾的几丁酶归属为 β/α-筒状蛋白，主要由与糖基转移酶亚族相似的蛋白质和 18 族几丁酶的 β 小片组成。其组分中含有公认的活性位点残基的 2 个氨基酸保守域。这族的蛋白质包括病毒、细菌、真菌、昆虫、爬行动物和一些植物蛋白（Muzzarelli，1997），如 *Serratia marcescens* 的几丁酶、*Streptomyces plicatus* 的内切糖苷酶、*Hevea brasiliensis* 的几丁酶溶菌酶、几种种子贮藏蛋白(narbonin)、刀豆外源凝集素和拌刀豆球蛋白。烟草天蛾几丁酶多肽主链中心部位的三维带状结构模型如图 3-5，这一结构是根据已知的 *Serratia* 的几丁酶 A 的三维晶体结构建立的(Perrais，et al.，1994)。将 *Manduca* 几丁酶的 80～387 残基与 *Serratia* 几丁酶的 227～534 残基进行比较，利用 Swiss-Model 软件获得了模式昆虫几丁酶的结构。在互联网上，提供了蛋白质的自动建模服务器。这 2 个区在氨基酸序列上表现出 81% 的相似性。18 族糖基水解酶的三级结构具有 1 个（βα）8 个筒状的折叠特征，其中 2 个相同的活性区与形成底物结合点的第三和第四筒状带相关。这类蛋白质结构常见的例子为 TIM-筒状蛋白。丙酮磷酸异构酶以这种折叠的原始类型而命名。在 TIM-筒状蛋白中，内部的筒状由 8 个等同的 β 筒状组成，外壳含有 8 个 α-螺旋，与筒状的轴定位成相似的外角（Levitt and Chothia 1976；Hubbard et al.，1997)。这一族中的所有酶，都可能显示出共同的三维结构，具有共同的水解机制(Heurissat and bairoch，1993)，并且在 2 个活性点的肽类位置上有 1 个天门冬氨酸和 1 个谷氨酸（Van Schelltinga et al.，1996)。在来自 *Bacillus circulansde* 的几丁酶中，同源活性点残基的定位诱变，导致酶活力的损失，或 $K_{cat}$值的剧烈下降，说明这些残基对催化作用十分重要。在烟草天蛾的几丁酶中，同源的残基是 321 位上天门冬氨酸和 325 位谷氨

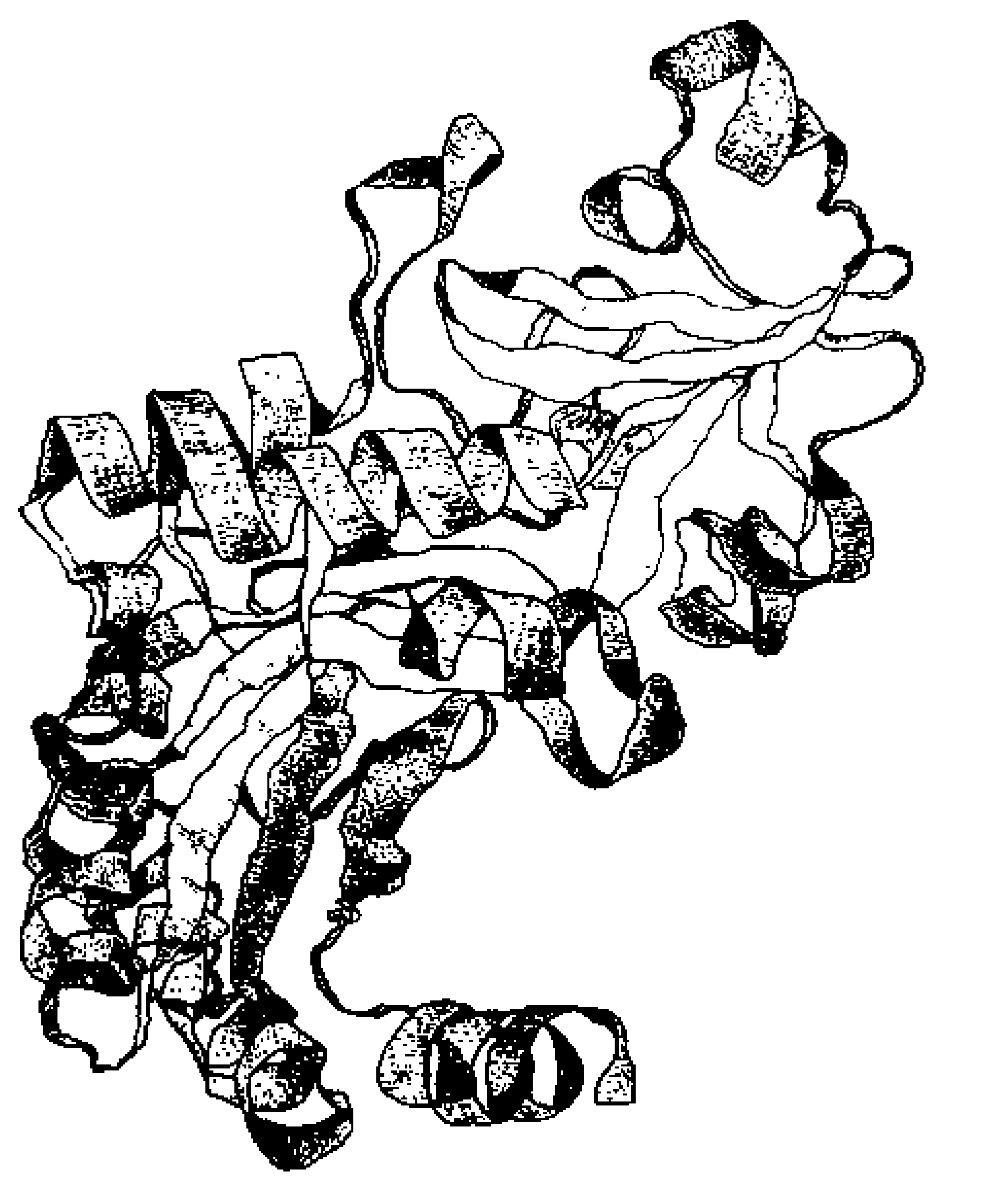


图 3-5 烟草天蛾几丁酶的带状结构模型

（仿 Kramer 等，1997）

酸。

从几种动物和微生物来看，几丁酶的结构具多区域特征，其中包括催化区富半胱氨酸的几丁结合区（区别催化区）和富苏氨酸/丝氨酸区（已被糖基化）。真菌、细菌和昆虫几丁酶序列的相似性，表明几丁酶有相似的催化部位，它既出现在昆虫和线虫的6-半胱氨酸C-末端，也出现在几种围食膜的蛋白质和一系列受体以及控制细胞黏附力的蛋白质中。一些植物和微生物的几丁酶以及其他几种无几丁酶活性的蛋白质中，在蛋白质的N-末端或C-末端，都具有包含几个半胱氨酸的几丁结合区。几丁酶上这些区的功能可能是将酶牢牢地固定在底物上，从而促进水解过程。

根据*S. marsccens*几丁酶的227～534氨基酸残基的三维结构建立模型，它与烟草天蛾几丁酶在氨基酸序列上表现出81%的相似性。但是在这一结构中，不包含烟草天蛾几丁酶的4～79和C-端的388～554氨基酸残基，因为这些区域与*S. marsccens*几丁酶的相似程度较低。

昆虫几丁酶基因的结构与蛋白质的多区结构是一致的。根据烟草天蛾几丁酶的基因克隆，它至少由11个外显子组成，长度大约11kb（ehoi et al.，1997）。一套外显子相当于蛋白质的识别结构（功能区域），以外显子单独编码整个信号肽。烟草天蛾几丁酶的成熟C-末端序列中，许多几丁酶中都出现2个保守的主题，可能含有活性的临界残基；几个糖基化和磷酸化的区域；富含丝氨酸/苏氨酸的区域；2个富含半胱氨酸的区域。

烟草天蛾几丁酶的氨基酸序列与植物几丁酶Ⅰ类和Ⅱ类氨基酶序列相似程度很小，但的确与植物几丁酶的Ⅲ类和Ⅳ类以及微生物的几丁酶有一定的相似性，特别是在烟草天蛾和其他无脊椎动物的几丁酶中有2个高度保守的区域，包括1个可能是酶活性点。烟草天蛾的几丁酶与家蚕的cDNA所编码的1种几丁酶具有高度的相似性（氨基酸序列具有96%相同），与对虾*Penaeus japonicus*有38%相似，与内寄生黄蜂（*Clelonus* sp.）的毒腺有37%的相似，与线虫*B. malayi*有27%相似，与1种真菌有26%相似，和1种细菌有25%相似。几丁酶与几种糖蛋白的相似程度较低。虽然糖蛋白不表现明显的几丁酶活力，但对碳水化合物也具有亲和性。

对昆虫、线虫、甲壳动物、哺乳动物和细菌等6种典型的生物体内的几丁酶的氨基酸序列进行了对比。结果表明，大多数序列的保守性表现在中心的催化区域，其中有影响催化活性的2个区。此外，不同来源的几丁酶都具有多个功能区，单个几丁酶拥有这些区的不同组合，连接催化区。在昆虫、线虫和人类的几丁酶中有富半胱氨酸的羧基区（在其他几丁酶中不存在）。这个羧基区是1个富脯氨酸/谷氨酸/丝氨酸/苏氨酸（PEST）区。最后是保守的半胱氨酸区，通过依赖钙离子的蛋白酶有增加蛋白水解的敏感性（Rogers et al.，1867）。

在幼虫取食期间，烟草天蛾几丁酶的基因不表达。仅仅是在幼虫蜕皮、化蛹或者蛹羽化到成虫之前的短暂的时间内，才开始表达。基因的活性受到蜕皮激素的正向调节和保幼激素的负向作用（Kramer et al.，1993）。如果基因在不需要时表达或者在需要时却不表达，则酶的出现或缺失对昆虫的生长是有害的；能持续表达的昆虫或植物或微生物可能是抗昆虫或抗真菌的。脊椎动物也含有可诱导的几丁酶。人类的巨噬细胞在激活状态下，能分泌大量的壳三糖，并且在患有高歇（Gancher）氏病人的血浆中壳三糖酶的含量很高

(Hollak et al., 1994)。这些几丁质水解酶可能起防卫真菌和线虫的作用。受线虫感染的哺乳动物经常产生线虫几丁酶的抗体(Fuhrman et al., 1992; Adam et al., 1996)。

## 2 几丁酶的利用前景

由于几丁酶的特殊功能，可以用来防治含有几丁质的有害生物，如昆虫、线虫和真菌(Carr and Klessing, 1989; Linthorst, 1991; Sahai and Manocha, 1993)。通过降解它们的活性结构(如昆虫的围食膜或表皮、线虫的卵鞘和真菌的细胞壁)使寄主得到抗性，或者引起寄主的防卫反应(Boller, 1987)。

昆虫的围食膜和表皮对环境的危害及捕食者的攻击起物理和化学的屏障作用。表皮的组分主要是几丁质和蛋白质，还含有一些脂类、儿茶酚胺的代谢产物、矿物质和其他一些微量元素。然而，一些昆虫病原真菌，如 *Metarhizium anisopliae*、*Beauveria bassiana*、*Nomuraea rileyi* 和 *Aspegillus flavus* 能够克服这种屏障。它们通过产生多元胞外降解酶(包括几丁酶和蛋白水解酶)，帮助病原体穿透屏障并促成侵染。一些昆虫的毒腺也含有几丁酶，可克服几丁质/蛋白质的保护，促进毒腺物质进入猎物体内。线虫 *B. malayi* 同样利用几丁酶降解寄主蚊子的几丁质表皮和(或)围食膜而进入蚊子体内。Allosamidin 是几丁酶的抑制剂。其抑制作用可通过蚊子吸血时加入外源的几丁酶而得到解除。杆状病毒也含有几丁酶的基因，在结构上与细菌的几丁酶相当。但是，这些酶侵染寄主的确切作用还不清楚，可能具有使寄主腐烂的作用。被昆虫、线虫、真菌、病毒和其他有机体用于蜕皮或穿透屏障的几丁酶在害虫治理上十分有用，可用几丁酶作为抑制剂的靶标，或者将病原体或害虫处于不合适的水平和生长阶段，使它们接触几丁酶，从而解除它们对寄主的防卫。

20 世纪 70 年代后期，发现几丁酶在体外可以降解昆虫消化道的围食膜。Brandt 等(1978)推测，几丁酶能引起膜穿孔，因此，使得病原体能进入敏感昆虫的组织内。许多年后，这种物理的作用才在体内得到证明。将来自 *Streptomyces griseus* 的外源几丁酶加到按蚊 *Anopheles freebori* 的血液中，可以阻止围食膜的形成。在扫描电镜下观察，由埃希氏大肠杆菌(*Escherichia coli*)所产生能编码 *S. marcescens* 的重组内几丁酶 ChiAll，在 0.1～10μg/ml 浓度下体外温育，能穿透灰翅夜蛾幼虫的中肠围食膜，5 龄幼虫在取食含有重组 ChiAll 的饲料后，也会出现围食膜穿透现象。

几丁酶也能促进昆虫病原真菌对寄主体表的穿透。当昆虫病原体 *M. anisopliae*、*B. bassiana*、*Verticilium lecanii* 和 *N. rileyi* 生长在昆虫表皮上时，将分泌几丁酶和 β-N-乙酰氨基葡糖酶。在进行体表穿透时，*N. rileyi* 强致病力个体比弱毒株系表现出较高的几丁酶活性。昆虫病原真菌几丁酶基因的表达受 1 种抑制剂——诱导剂系统的控制。在这个系统中，几丁质和降解的低聚产物起诱导剂作用。在产生几丁质的组织中，若加入碳水化合物、脂类和蛋白质，就会抑制几丁酶的产生。

测定表明，当一些种类的昆虫取食含有细菌几丁酶的食物时，基本上是无效的。在人工饲料中加入 *S. griseus* 的几丁酶〔浓度 0.09%(W/V)〕，在稻褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)的幼虫阶段没有出现死亡。同样，在锯谷盗(*Oryzaephilus mercator*)的饲料中，含有 1%～2% 的 *Serrstia* 和 *Streptomyces* 的几丁酶也没有引起死亡。这种几丁酶的不活跃性主要由于外源裂解酶代替了内源裂解酶，在降解几丁质时，前者的敏感性较弱，不如后

者有效。

## 第三节 表皮蛋白

作为昆虫表皮主要成分的蛋白质种类很多。有报道认为，1种麻绳（*Sarcophaga bullata*）的幼虫表皮中至少含有50种以上的蛋白质。昆虫表皮蛋白的种类因虫种和发育阶段而异。既使1种昆虫，体表部位不同，表皮蛋白的种类也不同，表现出来的物理性状也不同。可是，从生化的角度来看，昆虫表皮蛋白质依然是1种很含糊的定义，一般将纯化表皮所得到的蛋白，称为表皮蛋白。大多数表皮蛋白的分子量为 $(20\sim25)\times10^3$u。

### 1 表皮蛋白的提取与命名

昆虫表皮中与几丁质结合的蛋白质常用简单方法即可进行分离和纯化。其方法是先将由幼虫和蛹制备的粗表皮放人研钵中，加入液氮进行粉碎，然后对粉碎的表皮以低浓度和高浓度盐溶液反复洗涤和离心，除去可溶性蛋白质，再用8mol的尿素对沉淀进行抽提，透析抽提液，除去尿素，在低盐浓度下通过几丁质柱，凡与几丁质具亲和性的蛋白质便结合在柱上，而非结合性蛋白随溶液流出，用8mol尿素溶液洗柱，这时所回收的蛋白质即为具几丁质结合能力的主要表皮蛋白。

表皮蛋白的命名比较混乱，早期以电泳谱带的迁移大小分为1、2、3……号，以后又以分子量大小进行分类。现以家蚕为例，介绍当前表皮蛋白的命名。

家蚕主要表皮蛋白的组成比较简单。幼虫期主要有分子量为30、22、$17\times10^3$u的蛋白质。蛹期主要有29、23、$14\times10^3$u的蛋白质。这表明两个虫期的主要蛋白质构成是不同的。因此，幼虫期表皮蛋白以LCP表示，蛹期则以PCP表示。这些蛋白质按电泳图谱的顺序分别命名为LCP1、LCP2、LCP3，蛹期的蛋白命名各为PCP1、PCP2、PCP3。以后根据测定的分子量或核酸序列推导的分子量，重新以分子量进行名命，并冠以虫名缩写，幼虫表皮蛋白分别称为BmLCP30、BmLCP22和BmLCP17，蛹的表皮蛋白则命名为BmPCP29、BmPCP23和BmPCP14。其他昆虫的表皮蛋白命名原则相同。

命名中出现的混乱主要表现在各研究者先后应用的蛋白名称不同，如BmLCP30、BmLCP22和BmLCP17，先前已经被命名为LCP1、LCP2和LCP3。LCP3的分子量以氨基酸计算为 $17\times10^3$u，所以称LCP17。但按核苷酸序列推导，它的分子量为 $13\times10^3$u，因此又以 $13\times10^3$uLCP来表示。

### 2 不同虫期表皮蛋白的变化

Nakato较早制作LCP3和LCP2的抗体，运用免疫印迹杂交方法了解家蚕发育过程中表皮蛋白质的变化。从孵化后10h的个体中能被检测出时开始，发现它存在于整个幼虫期的体壁中，直到蛹蜕皮时才消失，但在羽化以后，可再次从体壁中检测到。然而，从成虫体壁中检测出的抗原决定残基的数量比幼虫期少，另外，电泳谱带也存在微小的差别。由此可见，以LCP3的抗体在成虫中检测到的蛋白质是与LCP3有相似结构的异种蛋白质。

另一方面，从以PCP2为抗原制备的抗体能够与3种蛹表皮蛋白质起反应，从这一事

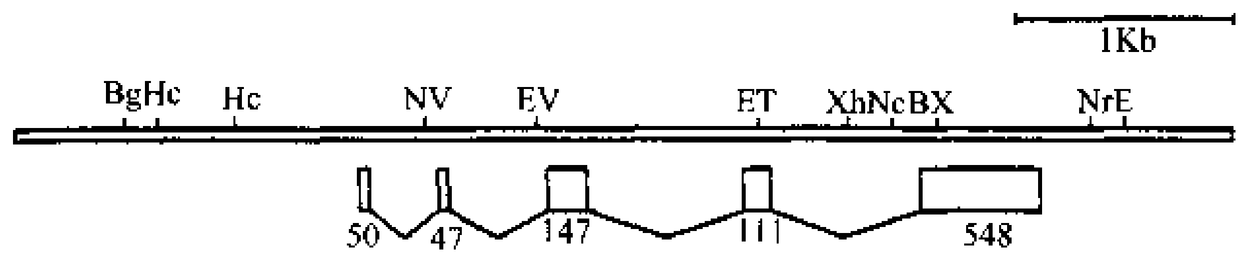
实可推测，蛹表皮中的各种蛋白质具有相似的结构。这种蛹表皮蛋白质相似的免疫化学性质在黄猩猩果蝇中也可观察到。家蚕的 PCP 与 LCP 相反，只能在化蛹后的几天内从蛹外皮中检测到。

## 3 表皮蛋白质的结构

将家蚕 5 龄初期的幼虫皮细胞中分离出的 mRNA 反转录成 cDNA，输入载体制成家蚕表皮细胞 cDNA 文库。用 cDNA 抗体对这一文库进行筛选，分离出数株 LCP-cDNA 克隆。

图 3-6 表示 LCP3-cDNA 的碱基序列和推测的 LCP3 一级结构。由碱基序列推测的丙氨酸（14）谷氨酸（26）之间的氨基酸序列，再将该序列与用 Edman 方法确定的纯

A




B

```
                                                        GTTTGCTTCATAACGACGAA    20

ATG CGT GTC TTT TTG GCA ATC TGC CTG TCT CTG ACA GTG GCG CTG GCC GCC GAA ACT     77
Met-Arg-Val-Phe-Leu-Ala-Ile-Cys-Leu-Ser-Leu-Thr-Val-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu-Thr-    19
                                                                ▲
GGA AAG TAC ACT CCT TTC CAG TAC AAC CGA GTT TAC TCT ACT GTT TCT CCA TTC GTC    134
Gly-Lys-Tyr-Thr-Pro-Phe-Gln-Tyr-Asn-Arg-Val-Tyr-Ser-Thr-Val-Ser-Pro-Phe-Val-    38

TAT AAG CCA GGC CGC TAT GTA GCT GAT CCA GGC CGT TAT GAC CCC AGC CGC GAC AAC    191
Tyr-Lys-Pro-Gly-Arg-Tyr-Val-Ala-Asp-Pro-Gly-Arg-Tyr-Asp-Pro-Ser-Arg-Asp-Asn-    57

TCT GGC CGT TAC ATT CCC GAC AAC TCT GGT GCC TAC AAC GGT GAC CGT GGA GAC CGT    248
Ser-Gly-Arg-Tyr-Ile-Pro-Asp-Asn-Ser-Gly-Ala-Tyr-Asn-Gly-Asp-Arg-Gly-Asp-Arg-    76

GGT GCC GCC GGT GGC TTC TAC ACT GGA TCC GGT ACT GCT GGA GGT CCC GGA GGA GCC    305
Gly-Ala-Ala-Gly-Gly-Phe-Tyr-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Ala-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-    95

TAC GTC GGA ACC AAG GAG GAC CTC AGC AAA TAC CTT GGT GAT GCT TAC AAG GGA TCC    362
Tyr-Val-Gly-Thr-Lys-Glu-Asp-Leu-Ser-Lys-Tyr-Leu-Gly-Asp-Ala-Tyr-Lys-Gly-Ser-    114

AGC ATT GTT CCC CTG CCC GTC GTG AAG CCT ACC ATT CCC GTG CCA GTC ACA CCC ACA    419
Ser-Ile-Val-Pro-Leu-Pro-Val-Val-Lys-Pro-Thr-Ile-Pro-Val-Pro-Val-Thr-Pro-Thr-    133

TAC GTT GCC AGC AAG GTG GTC CCA CCC AGC GGC GCC GGC TAC GAC TAC AAA TAC GGC    476
Tyr-Val-Ala-Ser-Lys-Val-Val-Pro-Pro-Ser-Gly-Ala-Gly-Tyr-Asp-Tyr-Lys-Tyr-Gly-    152

ATC ATC CGT TAC GAC AAT GAC GTC GCT CCC GAA GCT ACC ACT ACT TGT ACG AGA CCG    533
Ile-Ile-Arg-Tyr-Asp-Asn-Asp-Val-Ala-Pro-Glu-Ala-Thr-Thr-Thr-Cys-Thr-Arg-Pro-    171

AGA ACA AGA TTC TCG CTG AAG AAG CCG GCA AGG TCG AGA ACG TTG GCA CCG AAA ACG    590
Arg-Thr-Arg-Phe-Ser-Leu-Lys-Lys-Pro-Ala-Arg-Ser-Arg-Thr-Leu-Ala-Pro-Lys-Thr-    190

AAG GCA TCA AGG TCA AGG GAT TCT ACG AAT ACG TTG GCC CCG ACG GTG TCA CCT ACA    647
Lys-Ala-Ser-Arg-Ser-Arg-Asp-Ser-Thr-Asn-Thr-Leu-Ala-Pro-Thr-Val-Ser-Pro-Thr-    209

GAG TAG ACTACACTGCTGACGAAAACGGTTTCGTTGCTGACGGAGCTCACATCCCTAAGTAAATCTAGTCGAG    720
Glu ***                                                                         210

ATCAATATTTTAAGGTTATTTTAGAAAGAAAAGAAAAAAAAAAACGTACATAAAGCACCACTTTACTTTTACAGCC    795

ATTTGTCTAACCTTCTACCTACAAGATAATTAATCAGGCTATTATTTAATGTGTTTATCATGATAATAAAGATTG    870

CTCTGTGAAAAGCAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                         910
```

图 3-6 LCP3 基因和 mRNA 的结构以及推测的 LCP3 蛋白质一级结构

A. LCP3 基因限制酶切位点。字母缩写表示限制性内切酶内切位点、外显子和内含子结构，方形表示外显子，折线表示内含子，图下的数字表示外显子的长度（bp）

B. LCP3-mRNA 碱基序列（各行上列）和由此推断的蛋白质一级结构（各行下列）

黑三角为信号肽的切除点 浪线为 RGD 序列 直线为 polyA 附加信号（仿中藤博志等，1995）

LCP3N-末端的一级结构相比，两者完全相同，说明 cDNA 编码了 LCP3。另外，从氨基酸的对比可知成熟的 LCP3 是由一级翻译生成物切去 16 个残基的信号肽后生成的，是 1 种富甘氨酸和脯氨酸的亲水性蛋白质，成熟蛋白质不含甲硫氨酸残基。LCP3 的这种氨基酸结构是整个昆虫表皮蛋白质的特征之一。

从家蚕幼虫表皮细胞得到的 LCP-cDNA 克隆，含有编码 $13\times10^3$u 蛋白（LCP3）的 mRNA 序列克隆。检索蛋白质数据库后得知：这种 $13\times10^3$u 蛋白分子大小与黄猩猩果蝇（*Drosophila melangaster*）的 LCP1、烟草天蛾的 LCP14 以及 LCP16/17 等的幼虫表皮蛋白质相似，推测的一级结构也显示了很高的同源性。以家蚕幼虫细胞制成的 mRNA 进行体外翻译，结果表明细胞中含有大量的 13-mRNA，该 mRNA 的体外翻译产物与 LCP3 抗体能够发生强烈的交叉反应。这些结果表明 $13\times10^3$u 的 LCP 在家蚕体内很可能也是主要的表皮结构成分。然而，当用免疫印迹杂交的方法检测幼虫外表皮、体液、脂肪体的抽提液时，与 LCP3 抗体能产生反应的只有 LCP3，因此在各抽提液中均没有检测到。有关家蚕 $13\times10^3$u 的 LCP 以及它的 mRNA 的实体还有不少地方不清楚，只知道它在皮细胞中的翻译本当时就受到修饰。

在体外非细胞系统中，编码 $13\times10^3$uLCP 的 mRNA 同黄猩猩果蝇卵壳蛋白质基因扩增前出现的 mRNA 一样，它们都是在家蚕幼虫皮细胞中不被翻译的 mRNA。

## 4 幼虫表皮蛋白基因及其表达

家蚕的 LCP3 基因在染色体上占有 2.7kb，由 5 个外显子构成。各外显子的长度分别为：50、47、147 和 54kb。已知在家蚕的基因组中经常分布着特有的重复序列 Bm1 因子，这一碱基序列的一部分在 LCP3 基因的第四个外显子中检测到。在 LCP3 基因的上游，存在数个几乎完整的 Bm1 因子的拷贝。

由引物延伸法确定的基因转录起始序列，在翻译起始密码子中，35bp 上游的核苷酸为腺嘌呤 A，31bp 上游处具有典型的 TATA 盒区（TATAATAA），在基因转录起始位点上游 − 105 的位点上，可以看到与转录因子 AP1 结合区段极为相似的 TGAATTA 序列。有趣的是，在编码 $13\times10^3$uLCP 的基因的第一个内显子中发现 2 处 AAATGTATT 序列，而这一序列上游 2 个位点上，发现了 LCP3 基因上游 − 136 位上的 ATCGAGT 序列。由于这两个基因只发现于幼虫细胞中，以上序列可能在调控幼虫表皮蛋白基因的时空表达中起作用。

以 cDNA 为探针，用 northern 印迹对家蚕发育过程中表皮蛋白 mRNA 进行追踪，发现 LCP3 的 mRNA 在 4 龄以前，幼虫取食期间的皮细胞中合成，到 5 龄第 3 天起慢慢减少，在第 5 天几乎完全消失，此后在蛹的末期又有少量出现。这一结果反映了 LCP 的变动模式。5 龄前的 LCP-mRNA 变动与体液中的保幼激素浓度的变动是一致的。说明保幼激素积极地参与细胞内 LCP-mRNA 浓度的维持。当 5 龄第 3 天给予保幼激素类似物时，能抑制皮细胞中的 LCP-mRNA 的减少。通过核内第一转录产物的定量分析得知，保幼激素的这种效果不是保持 RNA 的稳定，而是使基因转录的活性化。由此可见，保幼激素诱导了 LCP 基因的转录。

LCP 基因的转录不仅受到保幼激素的诱导，同时也受到蜕皮激素的影响。在 5 龄幼

虫之前LCP-mRNA的量是不稳定的，在幼虫蜕皮前（停止取食期）减少，这时体液中的蜕皮激素的浓度暂时上升，说明蜕皮激素对LCP基因的转录起抑制作用。与此类似的现象在烟草天蛾中也观察到了。Hiruma等报道，在含保幼激素的培养液中培养的幼虫皮细胞中，添加20-羟基蜕皮酮时，幼虫表皮蛋白（LCP-14）的合成立即停止，如果将体系中的蜕皮酮减少，则合成又重新开始。至于这些昆虫激素是以何种机制参与基因转录调控的还无法知道。

虽然PCP-mRNA的情况与LCP-mRNA相反，它主要表达期集中在蛹蜕皮期，但是在幼虫蜕皮期、羽化前期也有少量表达。LCP3-mRNA的这种变动模式与体液中蜕皮激素的浓度变化相吻合，表明蜕皮激素可能具有促进基因转录的作用。向既不存在保幼激素也不存在蜕皮激素的5龄中期幼虫腹部注入20-羟基蜕皮酮，96h后皮细胞中的LCP3-mRNA就急剧上升。依据这一结果可以认为，蜕皮激素是PCP2基因表达的引发器。给予激素数10h以后mRNA才上升，表明蜕皮激素的作用可能是间接的。值得注意的是，在正常5龄幼虫LCP-mRNA水平的急剧上升期，出现在蜕皮激素高峰期后约96h。

## 5 表皮蛋白质的细胞连接活性

几乎所有的真核细胞都能够有效地结合胞外介质（ECM）蛋白。从一系列的实验中可以得知，ECM蛋白质不仅有连接细胞的功能，对细胞增殖、分化、移动，甚至对特定基因的表达也会产生影响。对于ECM蛋白质的细胞连接，在纤黏连蛋白（fibronectin）中以精氨酸、甘氨酸、天门冬酰胺（RGD）的三联体结构作为信号，RGD广泛存在于黏连蛋白（vitronectin）、胶原蛋白（collagen）和层黏连蛋白（laminin）等各种ECM蛋白质中，并具有信号作用。在细胞结构中，属于整合蛋白超级家族（integrin superffamily）的膜蛋白，它能识别RGD序列并使细胞体自身与ECM结合。

关于LCP3的一级结构，与脊椎动物胶原蛋白的结构极为相似。在研究时发现，家蚕的培养细胞BmN在铺有牛血清蛋白平板上成为球形，而铺有LCP3的平板上却呈平展分布，这表明培养细胞BmN能强烈地连接在平板上。另外，这种连接需要2价阳离子，但会被加入的RGD所阻碍。由于LCP3属于整合蛋白超级家族，因此它起蛋白质的配体作用。虽然LCP3在幼虫表皮中存在的部位目前还不清楚，但是从它对几丁质和细胞均表现出联接活性的这一点来看，也许起固定表皮细胞的作用。

## 6 表皮蛋白与表皮性质

昆虫的表皮不但因种类不同而外形各异，而且机械性和生物学功能也各不相同。但是它们都是由几丁-蛋白复合体组成的。虽然几丁质由于分子链的长短和乙酰化程度不同，会有一些变化，然而差异并不很大。但表皮蛋白的变化极大，从而影响不同表皮的机械性能。Hepburu和Joffe（1976），Vincent（1980）和Hillerton（1984）曾经先后论述过各种表皮的机械性能，并将表皮分为软表皮和硬表皮两类，实际上在两者之间还有许多中间型表皮。机械性能是随功能而产生的，并有其特定的分子生物学基础。

昆虫表皮及其性能不但因虫种而异，而且不同的发育时期和不同的生长区位也有很大

差异。各种表皮都有严格的分层特点，原表皮的外层是蜕皮前形成的，其蛋白质称为预蛋白（pharate proteins）或蜕皮前蛋白（pre-ecdysial proteins）；内层是在蜕皮后形成的，其蛋白称为蜕皮后蛋白（post-ecdysial proteins）。两者分别构成外表皮和内表皮。蜕皮前蛋白与儿茶酚衍生物交联，产生骨化作用，使表皮硬化，性质变得十分稳定，也不易抽提和提纯，但其中也有小部分没有骨化，仍然保持柔软的特性。蜕皮后蛋白只有小部分被骨化，或与几丁质以共价键结合，也容易抽提。表皮中不易抽提的部分可先通过水解，然后再提取并纯化，纯化得到的蛋白约占表皮总蛋白的56%。在蝗虫中，不能抽提的只占表皮总蛋白的10%（Andersen and Barrett，1971）。

昆虫表皮的组分和构型在变态时发生急剧的变化。如前所述，新表皮的合成和沉积受控于蜕皮酮和保幼激素的滴度变化。事实表明，激素调控昆虫表皮蛋白基因表达。

昆虫的硬表皮首先依赖于骨化作用的程度，是由儿茶酚胺衍生物的氧化产物渗入到表皮中完成的；其次是依靠蛋白质的修饰作用，并与蛋白质的疏水性能有关（Hillerton and Vincent，1983），这些蛋白的等电点偏向碱性。软表皮的骨化程度很低，蛋白质是亲水性的，等电点偏向酸性，与水结合的能力明显超过硬表皮。

在表皮蛋白中有一类特异性蛋白，在1961年为Weis-Fogh所发现，当时命名为节肢弹性蛋白（resilin）。它具有类似橡胶般的弹性，由1种或几种蛋白与2-、3-酪氨酸交联，形成肽分子内部热振动肽链，其蛋白质呈无规则的旋转。由于节肢弹性蛋白的完全不溶性，因此，给研究工作带来很多困难，至今所了解的氨基酸组分都来自小片材料（Bailey and Weis-Fogh，1961，Andersen，1971）。

有些表皮具有极高的伸展能力，如吸血蝽（*Rhodnius prolixus*）5龄若虫的腹部表皮。在吸血之前表皮是硬的，具有一定的抗性能力，但一旦开始吸血，表皮会迅速膨胀起来，使腹部容积变得很大。这种可塑性是在表皮 pH＜6 的情况下由激素诱导的（Reynolds，1975）。表皮的膨胀是可逆的，其中存在表皮组分之间的相互作用，并表现出对pH的依赖性。多数种类的昆虫蜕皮后预表皮的可塑性增加也是由激素调控的（Reynolds，1985）。

还有一些昆虫的节间膜有极大的伸展能力。性成熟的雌性蝗虫在产卵时腹部可由原来的4cm拉长到10cm，使腹部能深入土下产卵。这种表皮的半可塑性（visco-elastic properties）是由于几丁质填充在橡胶状蛋白网中，这种结构赋予表皮极大的伸缩性。Anderen（1987）用电泳比较了蝗虫节间膜中和腹部硬表皮中的蛋白质，但没有发现质的差异，其分子量为$28\times10^3$u，这种蛋白质可能对表皮机械性能起重要作用。

昆虫的上颚是高强度表皮的典型。蝗虫和一些咀嚼式口器昆虫的上颚，不但特别坚硬而且耐磨。研究结果表明，在上颚的切齿叶表皮中，蛋白质和金属离子有很大的亲和性，含锌和锰的表皮蛋白使上颚切齿叶变得十分坚固。

表皮蛋白的主要成分和次要成分都影响表皮性质。因此，搞清表皮中各种蛋白成分显得非常重要。近年来通过cDNA或基因组的序列推导表皮蛋白的氨基酸序列，或用提纯的蛋白分析氨基酸组分都取得了很大的进展。这对了解蛋白的分子折叠、分子内和分子间的相互作用以及进一步了解表皮的物理化学特性和生物学功能都是十分有利的。

# 7 各类昆虫的表皮蛋白

## 7.1 双翅目

### 7.1.1 果蝇

黄猩猩果蝇（*Drosophila melanogatter*）3龄幼虫的表皮，包括5种主要的和几种次要的脲素提取蛋白。从主要片段的氨基酸序列看，它们是不同基因的产物，不是相同基因翻译后修饰成的。Snyder 等（1982）报道5种主要蛋白的分子量 $9\sim18\times10^3$u，等电点 pH4.4－5.9。根据染色性质判断，没有一种主要蛋白是糖基化的。从果蝇基因组中分离到1种 $36\times10^3$u 蛋白的 DNA，并进行了克隆，总共发现5种基因，其中4种聚合成 7.6kb 的 DNA 群，在3龄幼虫表皮细胞中表达，编码的蛋白质在免疫学上有相关性，有3种已明确是表皮蛋白，另1种还需要进一步鉴定。

在4种基因中，根据 cDNA 克隆和测序的结果推导它们的氨基酸序列，并将纯化的幼虫表皮蛋白直接测定或从 N-端进行测序，获得的分子量如下：

DM-LCP1：Mr＝13 948/12 254，含114个氨基酸残基。

DM-LCP2：Mr＝13 487/11 809，含110个氨基酸残基。

DM-LCP3：Mr＝11 286/10 182，含96个氨基酸残基。

DM-LCP4：Mr＝11 979/10 322，含96个氨基酸残基。

从纯化蛋白 N-端开始得到的氨基酸序列中，开头16个氨基酸残基组成信号肽，在 mRNA 翻译时被去除。

DM-LCP2 有一种电泳中快速变型体 DM-LCPf2，出现在黄猩猩果蝇 2/3 变异品系中（Snyder 等 1982）。已经测定的突变基因序列，与 DM-LCP2 序列相比，在两个位点上氨基酸有了变化：18位上丝氨酸被亮氨酸所替代，108位上精氨酸已被丝氨酸替代。在 SDS 凝胶电泳上 DM-LCPf2 的迁移速率较 DM-PCP2 快10%，但它们的分子量相同。

在黄猩猩果蝇的 2/3 品系中，DM-LCP3 的基因是无活性的，它作为易位因子已分离出一个启动区，看来缺乏 DM-LCP3 的幼虫是可以存在的（Snyder 等，1982）。

4种基因编码的幼虫蛋白，与另1种果蝇 *D. miranda* 中得到分离和测序的蛋白同源（Steinemann 等，1993）。这种果蝇的 LCP 基因位于 X2 和 neoY 染色体上，比较其他种类的果蝇，相对应的基因位于常染色体上，它们的氨基酸序列略有差异。在 Y 染色体上的 LCP3 基因只有在 LCP1、PCP2 和 LCP4 的活性极低时才表达。据测定 *D. miranda* LCP 的分子量如下：

DMir-LCP1：Mr＝14 746/13 063，含122个氨基酸残基。

DMir-LCP2：Mr＝13 381/11 685，含110个氨基酸残基。

DMir-LCP3/4：Mr＝11 879/10 251，含96个氨基酸残基。

LCP3 和 LPC4 在不同的染色体位点上，却编码了相同的蛋白，说明它们是同源的。黄猩猩果蝇和另1种果蝇 *D. miranda* 的同源程度是：DM-LCP1 与 DMir-LCP1 为69%，DM-LCP2 与 DMir-LCP2 为73%，DM-LCP3 与 DMir-LCP3/4 为76%，DM-LCP4 与

DMir-LCP1为78%。

果蝇表皮蛋白在不同发育时期有其时序特异性（Chihara等，1982）。1、2龄幼虫的表皮蛋白电泳谱带相同，至3龄时出现明显的差异，在3龄和成虫之间又有明显的不同。蛹的表皮蛋白分为两类：大分子量为（40～90）$\times 10^3$u，其分子是糖基化的，不与几丁质结合，在蛹发育时沉积较迟；小分子量为（15～25）$\times 10^3$u，其分子并不糖基化，只与几丁相结合，在蛹的发育早期就开始沉积（Silvert等；1984，Doctor等；1985，Wolfgang等，1986）。

果蝇表皮蛋白基因属于Gart基因复合体（Gart gene-complex），另1个基因含1个内含子（Henikoff等，1986），基因产物是老龄幼虫和蛹的表皮蛋白组分，其分子量如下：

DM-PCP-Gart：Mr=20 633/19 072，含170个氨基酸残基。

在另1种果蝇*D.pseudoubscura*蛹的表皮中，发现相似的表皮蛋白（Henikoff and Eghtedarzadeh，1987）推导出分子量如下：

DP-PCP-Gart：Mr=21 476/19 547，含175个氨基酸残基。

两种Gart表皮蛋白之间的同源只有7%。

Apple和Fristron（1991）报道，黄猩猩果蝇3种基因编码蛹的表皮蛋白，它们受20-羟基蜕皮酮的调控，因此编号为EDG，氨基酸残基数和分子量如下：

DM-EDG78：Mr=13 344/11 581，含106个氨基酸残基。

DM-EDG84：Mr=20 365/18 594，含171个氨基酸残基。

DM-EDG91：Mr=15 292/13 153，含138个氨基酸残基。

Fristron等（1986）在黄猩猩果蝇幼虫和蛹中直接测定氨基酸序列有DM-LCPX、DM-LCPX2、DM-PCP8、DM-PCP15、DM-PCP19、DM-PCP21、DM-PCP25。前2种为幼虫表皮蛋白，后5种为蛹表皮蛋白，它们都是小分子蛋白，沉积时间较早，开始于蛹表皮形成期，存在于表皮外层（Wolfgang等，1986）。PCP19和PCP21（可能还包括PCP15）也存在于果蝇蛹的表皮内层，与几丁质中N-乙酰氨基葡糖相连结合。

在PCP19的N-端序列中，开头9个残基与随后蜕皮酮介导的蛋白EDG-78的信号序列中开头9个残基相同，它们之间关系很接近。推导EDG-78的分子量，除去信号肽之后是11 581u，显然小于PCP19的分子量（用电泳测定结果是$19\times 10^3$u）。

果蝇黄色突变体的幼虫和成虫体色不同于野生型，从中分离到黄色基因（Geyer等，1986），推导出蛋白质的氨基酸残基数及分子量如下：

DM-黄色原蛋白：Mr=60 410/58 008，含520个氨基酸残基。

该基因的产物在细胞之外，幼虫和成虫的表皮结构中都能测到（Kornegos and Chai，1992）。

关于果蝇成虫表皮蛋白的报道很少，Qiu和Hardin（1995）曾经获得$17\times 10^3$u的表皮蛋白。

### 7.1.2 麻蝇

麻蝇（*Sarcophaga bullata*）中已报道的幼虫表皮蛋白约60%能溶于SDS硼酸溶液中，已分离到21种不同的蛋白质。等电点聚焦电泳SDS-PAGE的pI为4.0～6.0，分子量（16～24）$\times 10^3$u，用等电点聚焦与HPLC阴离子交换色谱相结合的方法和Edman自

动降解技术，得到了 SB-LCP1、SB-LCP4 和 SB-LCP6 3 种蛋白的 N-末端序列。

SB-LCP1 中 10 位上是谷氨酸，另有报道是苯丙氨酸，在 24 位上分别为天冬氨酸和甘氨酸。在 SB-LCP4 中 21 位上是苯丙氨酸或赖氨酸。

SB-LCP6 的序列中，从 20 位残基开始的序列与 SB-LCP4 都可由 SB-LCP6 水解出来，而 2 种蛋白在有蛋白酶抑制剂的情况下仍然保持固定比例，因此它们又可能是由不同基因产生的，或者是由转录后形成的两种不同蛋白（Henzel 等，1985）。

### 7.1.3 丽蝇

丽蝇（*Calliphora* sp）的表皮蛋白中芳香蛋白的含量很高，含 6 个亚单位的芳香蛋白与血淋巴的贮存蛋白有关，它们在新表皮形成时变化成为表皮蛋白。在红头丽蝇（*Calliphora vicina*）中分别获得 2 种亚单位前体。分子量：

CV-芳香蛋白 A4 前体：Mr = 92 340/90 735，含 743 个氨基酸残基。

CV-芳香蛋白 C223 前体：Mr = 92 521/91 043，含 774 个氨基酸残基。

两个亚单位中所含的氨基酸残基与血淋巴蛋白或血蓝蛋白同源性可达 30%。

### 7.1.4 按蚊

在 100 多种已测序的表皮蛋白中，蚊子的表皮蛋白仅 Torre 等（1996）纯化和测序了 1 种。此后 Dotson 等（1998）报道，从冈比亚按蚊（*Anopheles gambiae*）表皮中克隆和测序的有几种表皮蛋白的多基因族，有 3 种基因（agep2a-c），各长约 1kb。cDNA 的开放阅读框架表明，有 95% 序列是相同的。这些冈比亚按蚊由表皮蛋白的转录仅限于预蛹期，并在蛹的早期表达。在推导的蛋白质氨基酸序列中有 1 个亲水区，与黄猩猩果蝇的 DM-EDG84 等蛹特异性表皮蛋白有明显的相似性。

## 7.2 鳞翅目

### 7.2.1 烟草天蛾

烟草天蛾（*Manduca sexta*）表皮蛋白基因表达有明显的时序性。两类表皮蛋白在 5 龄幼虫期合成。Ⅰ类多数或全部在取食期；Ⅱ类在末龄幼虫第 3 天出现，到漫行期停止。蛹的表皮蛋白合成在始蛹期第 2 天开始。蛹表皮蛋白明显不同于幼虫表皮蛋白，其抗体与其他蛋白不产生交互反应。蛋白质合成类型的变化是蜕皮酮和保激素滴度时序性变化的反应（Riddiford et al，1982）。至今已经测完了两种基因组和 cDNA 的序列，并推导了氨基酸序列。表皮蛋白的分子量是：

MS-LCP-14：Mr = 13 344/11 711，含 109 个氨基酸残基。

烟草天蛾的幼虫表皮蛋白，延长序列与黄猩猩果蝇幼虫蛋白 DM-LCP1 和 DM-LCP3 相似，两种幼虫表皮蛋白存在免疫交互反应。这种相似性也表现在麻蝇 *S. bullata* 幼虫表皮蛋白 SB-LCP1 与惜古比天蚕蛾的 HC-LCP12 之间。表皮蛋白的同源性最明显是在蛋白质 C-末端区，该区的保守序列是 G…G…Y-A-E-GY…P…P（其中连接符号代表任何一种氨基酸）。

烟草天蛾幼虫的Ⅱ类蛋白，在幼虫停食时合成。当时表皮的结构和机械性能发生变化，表皮片层的空间减少 50% ~90%，表皮的硬度急剧增加。Riddiford 等（1989）已经分离到 1 种小的多基因族，至少编码 3 种表皮蛋白，也是属Ⅱ类的，根据推导 LCP-16/17 的氨基酸序列计算的分子量如下：

MS-LCP-16/17: Mr = 12 226/10 604，含 94 个氨基酸残基。

MS-LCP-16/17 和 MS-LCP-14 之间，DM-LCP-1、DM-PCP-Gart 和 HC-LCP-48 之间的相似性非常明显（Hordyskiand and Riddiford，1989）。

烟草天蛾蛹有两种大分子表皮蛋白 MS-PCP120 和 MS-PCP246，分子量分别为 120 和 $246\times10^3$u（根据 SDS 凝胶电泳）。将放射性 β-丙氨酸注射到预蛹表皮中，证明它参与骨化作用，形成 N-β-乙酰多巴胺。

另有一些作者报道 MS PCP120 的 N-末端序列，它由黄猩猩果蝇黄色（yellow）位点编码，与表皮的色素型有联系。

### 7.2.2 天蚕蛾

Willis 等人对惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）幼虫、蛹和成虫的表皮蛋白进行了详细的研究，尤其是蛋白质在不同发育时和不同区位的特异性表达。用等电点聚焦电泳比较了幼虫、蛹和成虫的蛋白谱带，发现幼虫和成虫蛋白的相似性超过蛹表皮蛋白(Willis 等，1981)。不同部位上的差异超过不同虫期之间差异。蛋白质的等电点和成熟表皮的屈曲性有关。一般弹性表皮含酸性蛋白基因，这在硬表皮中是没有的。

软表皮中的糖蛋白量超过硬表皮中的。惜古比天蚕蛾表皮的主要蛋白和次要蛋白，都不与凝集素结合，甚至不能用考马斯亮蓝染色，说明蛋白中不存在甘露糖和 N-乙酰氨基半乳糖。惜古比天蚕蛾已有 7 种表皮蛋白获得 N-末端序列，它们的等电点和惜古比天蚕的表皮蛋白近似分子量（表 3-3）。

**表 3-3 惜古比天蚕表皮蛋白的等电点和分子量**

| 蛋白名称 | 来 源 | 等电点 | 分子量（$1\times10^3$u） |
|---|---|---|---|
| HC-LCP12 | 成虫节间膜、幼虫背腹 | 4.51 | 22 |
| HC-LCP17 | | 4.58 | 23 |
| HC-LCP45 | | 4.96 | 17.3 |
| HC-LCP48 | | 4.99 | 16.3 |
| HC-LCP65 | 蛹翅 | 5.3 | 11.5 |
| HC-LCP66 | 幼虫表皮突起、蛹翅、壳 | 5.4 | 14.6 |
| HC-LCP91 | | 5.7 | 17.5 |

HC-LCP12 具有异构体，N-末端起始的 2 个氨基酸（缬氨酸和脯氨酸残基）在 1 个异构体中缺失，其中 1 个样品的 42 位点上出现甘氨酸和亮氨酸，在 36 位点上早期出现组氨酸。

前面所列的 4 种蛋白来自软表皮，后 3 种来自硬表皮。软表皮和硬表皮蛋白在同类之间有相似性，但不同类之间无相似性。惜古比天蚕蛾的软表皮蛋白还与果蝇、烟草天蛾、麻蝇（*S. bullatas*）的蛋白相似，但 3 种硬蛋白之间无相似性。

HC-LCP12 和 HC-LCP66 已分别由 Binger 和 Willis（1994），Lampe 和 Willis（1994）

根据DNA序列推道出氨基酸的全序列，分子量如下：

HC-LCP12：Mr = 10 922/9 351，含87个氨基酸残基。

hC-LCP66：Mr = 13 877/12 093，含112个氨基酸残基。

### 7.2.3 家蚕

Nakato等（1990）较早从家蚕幼虫和蛹的表皮中分离到了几丁结合蛋白，方法是用几丁柱上的亲和性色谱，从两种不同类型的表皮中给出3种与几丁结合的主要组分，还有几种次要组分。纯化的蛹表皮蛋白BM-PCP2，Mr = 26 315，含253个氨基酸残基。推断信号肽切除点有两个，分别在18位丙氨酸和19位丝氨酸之间，和22位丙氨酸与23位谷氨酸之间，在序列中丙氨酸和脯氨酸残基的比例很高，并表现出一些特异性。如2个特征性序列主题，重复多次，但其中略有变化：Ala-Pro-Ala-His-Glu-（Asp/Ser）-Trp-Asn和(Ile/Val)-(Len/Ala)-(Asp/Glu)-Thr-Pro-Glu-Val-Ala-(Gln/Ala)-Ala-Arg-Ala-Ala-His-Leu（Ile）-（Ala/Ser）-Ala-（Leu/His）。另1种幼虫表皮蛋白BM-Pre LCP30，Mr = 22 442，含210个氨基酸残基。具有不同一般的序列，在168位点上，有胱氨酸残基，这种残基在表皮中比较少见，一般只出现于信号肽区。

Nakato等（1997）后来又纯化了家蚕幼虫表皮蛋白LCP17和LCP22，并进行了cDNA克隆。当时盐酸胍的抽提物分离和提纯以后，获得LCP17、LCP22和LCP30 3种和几丁结合的表皮蛋白。它们在孵化后24h开始出现，存在于整个幼虫期的表皮中，至末龄时增至最高值，都在蜕皮期间合成并逐步积累。LCP22在幼虫-蛹转化时消失，到成虫期就测不到。

根据cDNA克隆的核酸序列推导LCP17的基本结构在17～26位点上有Asp-Val-Ser-His-Ile-Ala-Lys-Ser-Asp-Gla。从蛋白质序列测定纯化的LCP17的N-端序列。在16个氨基酸残基的范围有1个疏水性的跨膜分泌的信号区。

LCP22由直接氨基酸序列获得1个双重N-末端序列（Tyr/Lys-Glu/Asn-Asn/Pro-Glu/Tyr-Phe/Arg-Tyr)，因此纯化的片段LCP22有两个不同氨基酸末端构成的特异性功能区，结合LCP22cDNA序列推导的基本结构中，在20位点上有1个Tyr-Glu-Asn-Glu-Phe-Tyr序列，在27～32位点上有1个Lys-Asn-Pro-Tyr-Arg-Tyr序列。这些在1～19位点上先导序列中，大多数残基都是疏水的，因而都是信号区，成为成熟肽时，在Arg19/Tyr20和Lys20/Lys27处切除。

推测的LCP17和LCP22的氨基酸序列与其他昆虫表皮蛋白有明显的相似性，尤其与烟草天蛾的LCP14（Rebers and Riddiford，1988）与黄猩猩果蝇的LCP1和LCP2也有很大的相似性。比较双翅目、鳞翅目和直翅目昆虫表皮蛋白的主题如Andersen等（1995）所指出的那样，羧基近端的亲水序列在所有昆虫中都是非常保守的，在几丁-蛋白和蛋白-蛋白之间稳定结构中起十分重要的作用。家蚕3种幼虫的表皮蛋白的分子量如下：

BmLCP17：Mr = 17 000/13 700，含127个氨基酸残基。

BmLCP22：Mr = 22 000/16 900，含142～149个氨基酸残基。

BmLCP30：Mr = 30 000/22 420，含210个氨基酸残基。

Nakato等（1997）指出，LCP17和LCP22与LCP30无同源性的生物合成mRNA水

平上有时序性调节程序，受到保幼激素滴度的控制。LCP30 与几丁质结合能力很强，并有表皮与细胞的连接功能，LCP17 和 LCP22 虽然也与几丁质结合，但无细胞结合活性。

### 7.3 鞘翅目

#### 黄粉甲

黄粉甲（*Tenebrio molitor*）是鞘翅目中报道表皮蛋白序列的唯一虫种，其幼虫的骨化表皮色泽较浅，成虫表皮都是骨化的，而且颜色很深。幼虫与蛹的表皮蛋白有明显的差异，但各时期虫体上不同部位之间的差异更为明显。幼虫或蛹的表皮在蜕皮前和成熟时差别很小（Andersen，1973）。但在成虫腹部背板和腹板之间存在差异。成虫表皮中甘氨酸含量是丙氨酸的 2 倍，而在幼虫和蛹的样品中两者的比例正好相反。

从 SDS-PAGE 凝胶电泳得到的结果表明，黄粉甲预蛹和蛹的表皮的可溶性蛋白组分有很大的相似性，而与预成虫的表皮无相似性（Andersen，1975）。

Roberts 和 Willis（1980），Lemoine 和 Dalachambre（1986）报道了幼虫和蛹的表皮蛋白有很大的相似性。但与成虫的则明显不同。从电泳谱带中看出，1 种水溶性蛋白的分子量约为 $18\times10^3$u，占水溶性蛋白重量的 10%，它的抗血清与 34～$35\times10^3$u 蛋白也有交叉反应。

Lemoine 等（1989）研究了抗水溶性表皮蛋白的单克隆抗体（MABs），分离到 16 种稳定的表皮抗体，其中有 1 种 MAB，能专一性识别分子量 $20\times10^3$u 的成虫蛋白，表明与幼虫或蛹表皮蛋白或与来自血淋巴或脂肪体的成虫蛋白无交叉反应。抗体能识别翅鞘或腹板中开头 30 个螺旋片层的 $20\times10^3$u 蛋白，这种蛋白存在于临近蜕皮前和刚蜕皮的表皮中心及皮细胞分泌的囊泡中。

Bouhin 等（1992）能观察到蛹与成虫分泌表皮时的 mRNA 转录物有很大的差别，这与表皮中获得的蛋白电泳谱带是一致的。用免疫印迹翻译产物和抗 $20\times10^3$u 蛋白的 MAB，识别了 1 个成虫特异性蛋白，初步测定分子量约为 $22\times10^3$u，称为 TM-ACP22，对应的 mRNA 存在于翅鞘的皮细胞中，出现在预成虫开头 80h，在化蛹前 1d 消失。mRNA在皮细胞中的表达只限于分泌表皮的区域，以后的骨化程度很高。

Chazles 等(1992)克隆并测序了 cDNA，它对应于黄粉甲翅鞘的另 1 种蛋白，分子量约 $18\times10^3$u，纯化并测定了 1 个片段的序列。合成的寡核苷酸序列为 Ala-Glu-Pro-Psp-Gly，并被用来筛选 cDNA 文库。该文库由预成虫的翅皮细胞构建，最终克隆了 cDNA。用原位杂交确认，对应的 RNA 仅限于某些皮细胞中。这种皮细胞分泌的表皮都是注定要骨化的，它在预表皮开始沉积时出现，直到蜕皮后 12h。由 cDNA 来推测氨基酸序列，原蛋白含 208 个氨基酸残基，蛋白质被命名为 TM-ACP20。

综合上述两种成虫表皮蛋白，根据完全序列报道和电泳测定的分子量如下：

TM-ACP22：Mr＝20 701/18 733，含 180 个氨基酸残基。

TM-ACP20：Mr＝20 070/18 398，含 191 个氨基酸残基。

据 Charles 等（1992）和 Bouhin 等（1992）报道，在上述成虫表皮蛋白中，富甘氨酸区连接 1 个亲水区。

此后，在黄粉甲预蛹表皮中又分别纯化和测序了 TM-PCPEla TM-PCPF1 的全氨基酸序列（Andersen et al，1995；Haebel et al，1995）。它们作为幼虫和蛹预表皮的共同蛋白，类型之间仅微小变化。高度疏水性重复主题 Ala-Ala-Pro-（Ala/Val）超过常量 23 倍。TM-PCPE1 的 Mr＝23 188。

Andersen 等利用电射电离质谱仪（electrospray，ionigation mass spectrometry，ES-IMS）和等离子体解吸质谱仪（PDMS）分析了黄粉甲幼虫和蛹表皮中 6 种表皮蛋白的序列，发现很多表皮蛋白是多种异构的混合物，其中以 1 种为主，几种为辅，并详细报道了各异构体之间的差异。6 种预蛹表皮蛋白和 3 种幼虫表皮蛋白的异构体如下：

TMPCP-Gla 的 Mr＝20 850，含 1 211 个氨基酸残基。

TMPCP-Glb 的 Mr＝20 867.8。

TMPCP-Glc 的 Mr＝20 878.8。

以上 3 种异构体中，以 Gla 为主，其余两种含量很少。

TMPCP-Hla 的 Mr＝18 927.7。

TMPCP-Hlb 的 Mr＝19 986.8。

TMPCP-Hlc 的 Mr＝19 182.7。

其中 Hlc 的量很多，其余两种较少。

TMPCPGla 的 Mr＝15 856.80　　PCPClb 的 Mr＝15 887.2，含 161 个氨基酸残基

其中以 Clb 为主。

在幼虫表皮蛋白中分离到 3 种异构体：

TM-LCPA1a 的 Mr＝17 692.5，含 174 个氨基酸残基。

TM-LCPA2b 的 Mr＝12 273.0，含 117 个氨基酸残基。

TM-LCPA3a 的 Mr＝13 974.3，含 134 个氨基酸残基。

黄粉甲的 6 种幼虫-蛹表皮蛋白的完全氨基酸序列中，反映出主要组分是碱性和微酸性蛋白。这些蛋白与其他昆虫的表皮蛋白有明显的相似性。在 3 种微酸性的幼虫-蛹黄粉甲表皮蛋白中，有 66 个残基的中心亲水区，与双翅目黄猩猩果蝇、鳞翅目的惜古比天蚕蛾、直翅目的飞蝗表皮蛋白有相似的区；有 3 个幼虫-蛹碱性表皮蛋白，其中有 51 个残基的亲水区与飞蝗预成虫表皮的 2 种蛋白是共同的。如 TMPCP-Ala 中心的亲水区与 LM-ACP7 的序列有 78%相同，与 LM-ACP8 有 65%相同，与 LM-ACP9 有 65%相同，与 TM-ACP20 有 51%相同与 DM-EDG84 有 68%相同，与 HC-LCP66 有 53%相同。但主要保守置换都不在相同的位点上。可见黄粉甲幼虫-蛹表皮蛋白也与蝗虫成虫表皮蛋白相似，经常出现的短序列主题都是 Ala-Ala-Pro-Ala/Val。昆虫不同目之间表皮蛋白的相似性表明，序列保守性在功能上有十分重要的意义（Andersen 等，1997）。

## 7.4 直翅目

### 7.4.1 蝗虫

经多年研究，对飞蝗（*Locusta migratoria*）的表皮蛋白性质和分子基础，特别是不同部位表皮的机械性质的差异已经具有较多的了解。蜕皮以后表皮蛋白的谱带会发生急剧

变化，预若虫和预成虫的表皮蛋白分别区别于它们成熟表皮。蜕皮后1d的抽提物中，已经见不到预成虫的表皮蛋白，说明蜕皮后蛋白由于骨化作用已无法抽提（Andersen and Hljrup，1987）。从飞蝗成虫腹部表皮提取的蛋白，用单相或双相凝胶电泳，结果表明，与蜕皮前2d只有量的差异。

蜕皮后的骨化作用使表皮蛋白分为两类，成蝗蜕皮前的表皮约含80%的蛋白，其中有8%的蛋白不能用6mol脲素抽提，估计它们与几丁质形成共价键结合。

蛋白质的主要部分可以用酸性（＜pH4）或碱性（＞pH10）溶液抽提，仅一小部分蛋白可溶于pH7～10溶液中。降温到20℃可以提高蛋白的溶解度（Andersen et al.，1986）。双向凝胶电泳表明飞蝗的预表皮含有100种以上的蛋白，它们分别构成区位的差异。比较后足腿节、胸部腹板、腹节及节间膜，以及前翅和后翅的表皮蛋白，发现其中有很多蛋白无区位差异。但往往染色程度不同，有些蛋白仅限于少数部位中。前翅和后翅有相同的蛋白谱带，明显不同于其他区域。谱带中7、8、19、63、64和65号蛋白存在于翅突中，在腹部含量很少，在胸部和腿节中几乎没有（Andersen，1986）。

有些蜕皮前表皮蛋白已经利用离子交换气谱、凝胶过滤和逆相HPLC结合的方法得到纯化。蛋白质的聚集强度对纯化有妨碍，因此在操作过程中，需要使用脲的浓缩液，以保持蛋白质的可溶性。大多数蛋白质是高度疏水的，一般富含丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

蜕皮后可抽提的蛋白等电点为pI4～4.5。亲水性超过蜕皮前的蛋白，分子量较小，(10～30)$\times 10^3$u，在不同区位之间也有一定的差异，但量的差异不如蜕皮前明显。

成蝗中已获得10种蜕皮前蛋白的完全氨基酸序列、2种蜕皮后蛋白以及3种小蛋白。这些小蛋白根据2种来自4龄蜕皮后的若虫，1种来自蜕皮后的沙蝗成虫。已知各种蛋白的氨基酸序列如表3-4。

**表3-4　蝗虫表皮蛋白的比较**

| 名　称 | 来　源 | 分子量（u） | 氨基酸残基数 | 作　者 |
|---|---|---|---|---|
| LM-ACP7 | 翅预表皮 | 13 423 | 131 | Arogh 等，1995 |
| LM-ACP8 | 翅预表皮 | 15 224 | 148 | Klasrkor 等，1989 |
| LM-ACP19 | 翅预表皮 | 16 127 | 157 | Korgh 等，1995 |
| LM-ACP38 | 预表皮 | 15 320 | 163 | Højrup 等，1986 |
| LM-ACP63 | 翅预表皮 | 14 492 | 157 | Krogh 等，1995 |
| LM-ACP64 | 翅预表皮 | 14 050 | 152 | Krogh 等，1995 |
| LM-ACP65 | 翅预表皮 | 13 318 | 145 | Krogh 等，1995 |
| LM-ACP67a | 预表皮 | 9 862 | 98 | Andersen 等 1993 |
| LM-ACP67b | 预表皮 | 10 417 | 104 | Andersen 等 1993 |
| LM-ACP70 | 胸、腿预表皮 | 8 314 | 88 | Andersen 等 1993 |
| LM-NCP76 | 胸、腿预表皮 | 13 695 | 139 | Andersen 等 1993 |
| LM-NCP62 | 中龄若虫表皮 | 9 052 | 88 | Nφhr 等，1992 |
| LM-NCP55 | 中龄若虫表皮 | 3 216 | 33 | Nφhr 等，1992 |
| LM-ACP-add4 | 成熟成虫腹表皮 | 12 246 | 106 | Talbo 等，1991 |
| LM-ACP-add5 | 成熟成虫腹表皮 | 8 930 | 82 | Jespersen 等，1995 |

在蝗虫蜕皮之前形成的表皮，蛋白质明显呈碱性，且为疏水性；蜕皮后形成的表皮呈酸性，且具亲水性（Andersen，1988），但蛋白中氨基酸序列是相同的。

蜕皮前蛋白 LM-ACP7、LMACP8、LM-ACP19 酸性很强，和蜕皮后蛋白 LMAbd-4、LMAbd-5 和 SgAbd-5 具有相似的序列（Andersent et al，1995），最明显是在蜕皮前蛋白和 LM0Abd-4 的中心区和相当于 LmAbd-5 和 SgAbd-5 的 C-末端部分。

性成熟的雄蝗和雌蝗的内表皮蛋白，在两性之间和区位之间只存在数量上的差异。Abd-1 在雄蝗表皮中几乎没有，而在雌蝗腹部是主要蛋白，在沙蝗的表皮蛋白的抽提物中，约占 40%（Andersen，1988）。这与雌蝗腹部 4、5、6 和 7 节的节间膜特别富于伸展性和黏弹性有重要关系。

节间膜的黏弹性是由于皮表是一种蛋白质复合物。几丁纤维的方向通常自几丁微丝方向伸展，对材料的硬度没有作用，节间膜中蛋白质的主要部分是在性成熟前沉积的，当时并无伸展性，后来转化为有高度伸展能力和黏弹性的材料，依赖于 JH 滴度的增加（Tychsen and Vincent，1976），这种机械性能的变化，在 2d 内完成。这是由于表皮蛋白之间相互作用的减弱，或者是由于膜内 pH 和离子强度的变化。

ACP-19 的异构体中，36 位点上的赖氨酸被苏氨酸取代，ACP-70 的异构体是 82 位点上的酪氨酸被苯丙氨酸取代。在 LM-ACP-abd9 蛋白中含有后翻译修饰作用，它们的 N-末端是焦谷氨酸，C-末端是脯氨酰氨，还有一些苏氨酸带有 N-乙酰半乳糖胺残基。

从蝗虫预表皮蛋白区域定位中最常见的氨基酸残基是丙氨酸、脯氨酸和缬氨酸，或者是甘氨酸、酪氨酸和亮氨酸。在富丙氨酸区中常见 Ala-Ala-Pro-Ala/Val 重复，在 9 种已报道的预表皮蛋白中，这种重复序列出现了 62 次，其中 50 次是 AAPA，12 次是 AAPV，这种重复序列也存在于若虫蜕皮后蛋白中，在蜕皮后成虫表皮蛋白中却至今尚未发现。

骨化以后表皮变硬但不脆，具有较弱的弹性，可弯曲而不破碎，并在外力消除后能回复到起始状态。表皮的不同机械性能是由表皮失水和芳香残基的增加造成的。在骨化时儿茶酚和蛋白交联，有关内容将在下一节中讨论。

总之表皮蛋白的序列是 1 种不同小主题组成的集合体，它们之间以各种不同方式联结在一起，有些主题，特别是亲水性的，它与专一性识别和骨化过程有关，而疏水性的主要功能是形成蛋白的折叠构型，使分子有弹性和可塑性。

### 7.4.2 沙蝗

在性成熟的成蝗腹部表皮中，Andersen（1995）已经抽提到 7 种表皮蛋白，并且进行了纯化和测序。这些蛋白在预成虫中是不存在的，可能是在蜕皮以后沉积为内表皮，所有蛋白都含在一般表皮蛋白中，具有 Rebers-Riddiford 相同的序列，其 N-端由焦谷氨酸残基封闭，大多含 1 个或多个 N-乙酰已糖胺残基，推测 N-乙酰半乳糖胺（GalNAC）以O-键连接到苏氨酸或丝氨酸残基上，另 1 种蛋白由胺基封闭的 C-末端。蛋白质非糖基化形式的分子量（9～20）$\times 10^3$u。

SgAbd-1 的分子量 19.7～20.3$\times 10^3$u，N-乙酰已糖胺的修饰后，每个残基增加分子量 203.2u，全序列共 185 个氨基酸残基，整个蛋白 N-末端是封闭的。

全蛋白胰蛋白酶降解，用 Edman 降解测序获得 T1-10 的 10 种多肽，以胰凝乳旧白酶降解获得 C1-9 的 9 种多肽，用 Glu-C 和 Lys-C 肽的蛋白内酶分别获得 11 和 6 种多肽。

SgAbd-1、SgAbd-3、SgAbd-4、SgAbd-6 和 SgAbd-8 相似序列比较，SgAbd-9 分子量

$13.5\times10^3$u。

从中可以看出，沙蝗的8种蜕皮后表皮蛋白氨基酸序列和飞蝗2种蜕皮后蛋白（Talb et al 1991，Jespersen et al，1995）都含有1个高度保守的序列（65～87个残基）。沙蝗8个序列与果蝇幼虫和蛹表皮蛋白，家蚕、烟草天蛾幼虫表皮蛋白都内含Rebers-Riddiford保守序列（$Gx_8Gx_{86}YXAXEXGYX_7PX_2P$）（Rebers and Riddiford，1988）在完全型突变体中截去了2个C-末端残基。

沙蝗8种表皮蛋白所含的主题Pro-Thr-Pro-Pro-Ile-Pro，也存在于果蝇幼虫表皮中（Snyder et al，1982）。在其他几种表皮蛋白中，有关的富脯氨酸区，在沙蝗蛋白中主题的第二位上的苏氨酸，有1个O-键连接的N-乙酰已糖残基，而在果蝇表皮蛋白中苏氨酸并不糖基化（Silvert et al，1984）。蛋白质之间的相似性超过Rebers -Riddiford保守序列，不同长度的间隙插在序列中心附近，在N-末端区有保守位点，除2个序列以外，其余各序列都有2个严格保守的甘氨酸和第三个甘氨酸，而且像芳香基或疏水性等功能性残基中那样，在某些位点上也有明显的相似性。

根据序列的特异性，Andersen（1998）将沙蝗的表皮蛋白列为Rebers-Riddiford保守序列中的1个亚类，称为RR-1亚类。在这亚类中还包括黄猩猩果蝇中幼虫表皮蛋白和另1种果蝇（*D.mirada*）的蛹表皮蛋白，以及飞蝗的内表皮蛋白。它们主要存在于柔软可弯曲的含水合物的表皮中。在双翅目幼虫表皮、节间膜和蝗虫内表皮中，一般都是亲水性的。

另一类Rebers-Riddiford保守序列的表皮蛋白含GFNAVV主题，序列中缺少谷氨酸残基，在C-末端缺2个脯氨酸残基，这一亚类称为RR-2亚类。在黄粉甲幼虫和成虫、蝗虫预表皮和惜古比天蚕蛾幼虫及蛹表皮中都有存在。在惜古比天蚕蛾中得到的HC-CP66，也属这一类，存在于幼虫的气管、蛹翅和蛹的骨片中。

含RR-2亚类的表皮趋向于骨化而变硬。从中也说明不同类型的表皮所反映的机械性能。表皮蛋白和几丁质纤丝的复合物给表皮各种硬度、延展性、坚固性、水合能力和抗降解能力。

成蝗蜕皮前后抽提到的蛋白质的主要区别是骨化与否。性成熟的雌虫或雄虫的节间膜之间机械性能不同。雌的有极大的延展性，而雄的伸长能力很小。Abd-1与Abd-6是性成熟雌蝗腹部表皮蛋白的主要组合。在沙蝗雌虫表皮可抽提蛋白中分别是42%和90%，但在雄虫中仅20%和1%。在飞蝗中也是这样。但这两个种的胸部表皮内Abd-1与Abd-6都很少，较多的是Abd-2、Abd-3、Abd-4和Abd-5。雌蝗和雄蝗蜕皮后沉积的蛋白在腹部骨片或节间膜中是相同，但两种的节间膜延展性相差10倍。Andersen（1998）认为差别在于表皮中几丁纤丝系统的微构型不同。在雄虫节间膜中，几丁纤丝呈螺旋型，而在雌虫中呈平行排列，拉动纤丝时向平行方向伸长（Vincent，1995）。

在飞蝗内表皮Abd-4、Abd-6和Abd-8中，在富脯氨酸区有1～3个N-乙酰半乳糖胺残基，以O-键与苏氨酸残基连接（Talbo et al，1991）。沙蝗的内表皮与此相似，通过酸性水解，失去乙酰基团，分子量203u，用酸处理能水解它们与苏氨酸或丝氨酸连接键。Abd-1和Abd-6在性成熟的雌蝗腹部节间膜中，产生高度伸展性，程度远远超过雄虫。Abd-6酸性较强而Abd-5硬度较大。

Abd-1 不同于其他表皮蛋白，在 N-末端有保存 86 残基的中心区，其中 26 残基是富脯氨酸，并有 1 个含 7 个脯氨酸排成 1 行的序列。由于含脯氨酸亚氨基团的肽键有限的旋转，Abd-1 的 N-末端区比其他肽键少柔韧性。Abd-1 作为黏弹性节间膜上的优势蛋白，对膜的机械性能有很大的关系。

再从飞蝗已测序的 LMAbd-1 和 LMAbd-5 和沙蝗的相比，有很大的相似性。以 LMbd-5 与 SgAbd-5 为例，两者仅 2 个位点上有变化，如丝氨酸取代苏氨酸，异亮氨酸取代亮氨酸（Jespersen et al，1995），在 LMAbd-4 和 SgAbd-4 中 5 个位点有变化，位点 4 丝氨酸取代脯氨酸，70 位点上谷氨酸取代丝氨酸，74 位点丝氨酸取代谷氨酸，110 位点上脯氨酸取代丝氨酸，114 位点上丙氨酸取代脯氨酸，两种 Abd-4 只有 1 个共同特性是 C-末端有羧酰胺基团。

沙蝗和飞蝗分属檬翅蝗亚科和斑翅蝗亚科，它们共同的特征序列，赋予表皮相似的机械特性。保证雌蝗腹部的伸长，将卵产在深达 10cm 的土中。

## 8 表皮蛋白的同源性

对于如此众多的昆虫表皮蛋白，使人想起它们之间同源性。Andersen 等（1995）对此进行了广泛而深入的研究，其中包括氨基酸序列的主题，特别是甘氨酸、亮氨酸和酪氨酸残基的主题以及丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-丙氨酸或缬氨酸重复。同源性表明，氨基酸序列的保守性对昆虫表皮的物理化学性质有重要意义。总之结构相似的表皮，正表明它们的起源是相同的。

### 8.1 保守主题

已测序的蛋白之间，有的只存在一个或少数几个位点的氨基酸差异，从而形成蛋白的变异或异构体，而有一些蛋白相互之间差异极大，似乎不是同“族”蛋白，它们在进化过程中并非是同源的。为使同源性有一个客观的标志，一般以蛋白的序列相比，凡氨基酸相似性达 30% 以上的，被认定为存在同源性。某些较短的主题如 AAPA/V 的重复出现很可能是同一祖先在长期进化过程中不断扩散的结果。以不同的昆虫约 20 种蛋白序列，按 2 种 1 组进行配对比较，如 LM-abd5/SG-abd5 和 DM-LCP1/DM-LCP2。若以同类氨基酸残基（谷氨酸和天冬氨酸，谷氨酰胺与天冬酰胺，赖氨酸与精氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸与色氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸）作为保守置换的结果，则明显存在主蛋白的相似性。在 20 种蛋白序列中都有 1 个亲水区，它的序列在 LM-ACP7 相当于 62～89 位点，存在如下保守序列。

G－－－－－－－－（D/E）G－－－－－（V/L）－（Y/F）－A－－－－G（Y/F） －－并以 G-XG-（D/E）G-X（5）-（VLI）x（YF）xA-x（3）-G-（YE）’表示，以任何 1 个氨基酸终止。

根据 Rebers 和 Riddiford（1988）对一些序列的鉴定和比较，保守序列之间有微小差异，保守的 3 种残基（LM-ACP7 中在 62，71 和 85 位点上）是甘氨酸，2 种（78 和 86 位）是芳香族残基（酪氨酸或苯丙氨酸）1 种 70 位点处是酸性残基，而位于 76 处是 1 个带支链的脂族残基，80 位点处例外，是 1 个丙氨酸残基。

序列比较中，LM-ACP7 的 34～61 位点上，也可以看到各蛋白之间的相似性，其明显程度仅次于 62～89 位点上的 28 个残基。另外还可以看到在 37 位点上有脂族残基，42 位点上有 1 个酰胺或酸的残基，46 位上有甘氨酸的同源性趋势。

相似性也出现在果蝇表皮蛋白中 N-和 C-末端区，此外还具有不少零散的相似性。果蝇的序列中较近 C-末端含有 1 个富脯氨酸区，这一现象也出现在 MS-LCP14 中和 LM-abd4 中，当然可能是随机的。在大多数蛋白的亲水区，对应于 LM-ACP7 的 32～81 位点上，并在序列中间有 1 个保守区。在 N-和 C-末端位侧链延伸，形成 1 个 3 分支结构。LM-abd5和 TM-ACP22 的 C-末端和 HC-CP66 中的 N-末端的延伸都很短。

已测定序列的半数表皮蛋白中都有 28 个残基的疏水序列，说明它在表皮中具有重要功能。包括与几丁质的结合，并表现出时序性。Hackman（1974）报道，幼虫表皮中含 63%的蛋白，其中 56%是与几丁质共价键结合的复合体，因此即使经彻底抽提的表皮中，仍然含有一定数量的蛋白质。在几丁蛋白复合体中蛋白部分覆盖在几丁纤丝的表面，在复合体内层与几丁牢固结合，这种蛋白就很难用溶剂提取出来。

6 种已测的蛋白中（1 种蝗虫和 5 种果蝇含有 XPTPPPXP 的 8 肽序列，其中 X 是 F、I、L 或 V 等疏水性氨基酸残基，在烟草天蛾的 MS-LCP14 内，含有变型的 LPTPFPTV 序列成为 XPXXPPPZXP 主题（X 是任何 1 种氨基酸，Z 是疏水氨基酸）。根据 Egan 等（1993）、Ren 等（1993）和 Yu 等（1992）的研究，这种疏水区的相似序列，在表皮蛋白中具有特异性识别功能，与蛋白质的相互结合有关，其中有疏水和静电等方面的非专一性，也有高度特异性结合作用。

8 肽序列中位点 3 有 1 个氨基酸，在 LM-ACP…abd4 中因连接 N-乙酰半乳糖胺残基而糖基化，与第一个苏氨酸近旁还有两个苏氨酸也存在类似的修饰（Talbo 等，1991）。根据 DNA 序列推导，在果蝇和烟草天蛾中是否糖基化还不清楚。Snyder 等（1982）报道，果蝇幼虫表皮中 1 个主要蛋白是糖基化的。富脯氨酸 8 肽，可能是具有分子间调节结合状态和进行识别的功能。

如上所述，某些表皮蛋白具有共同的短主题。家蚕的蛹表皮蛋白的特征是一个序列重复 3 次，而在蜚蠊 *Blaberus cranifer* 的中龄若虫蛋白的类似序列中，至少重复 2 次。例如：

Bm-PCP：ILDTPEVAQARAAHISAL
VAETPEVAQARAAHL AAL
ILDTPEVA AARAAHL AAH

Bg-NCP-abd2：VADTPEVA SAKAAHFAAY
PADTPGVAAAKVAHFAAH

这种序列在其他昆虫的表皮蛋白中尚未见有报告，其功能可能与表皮的基本性质有关。

在表皮蛋白中有些 C-末端区有富组氨酸趋势，在 37 个序列的 C-末端，这类氨基酸增加了 15 倍，在次末端增加了 10 倍。其功能可能与表皮骨化有关。在生理学 pH 范围内，组氨酸可能转化为 N-乙酰多巴胺。pH 的轻微变化能够影响组氨酸中咪唑基团的解离，改变表皮与水的结合能力和蛋白质之间的相互作用。

### 8.2 甘氨酸、亮氨酸、酪氨酸四肽主题

从果蝇成虫器官中，1 种依赖蜕皮酮的基因产物（DM-EDG91），有明显的富甘氨酸、亮氨酸和酪氨酸残基（Apple and Fristrom，1991），含这 3 种氨基酸的蝗虫蜕皮前表皮伸展性能较弱。在蝗虫的蛋白中，伸展力集中表现在 N-末端区或者接近 C-末端。有关 N-末端的序列是：

LM-ACP19：GYLGGY

LM-ACP30：GLLGLGYGGYGGYGYGGIGHGIGL

LM-ACP38：GYLGGI

LM-ACP54：GYLGGY-

LM-ACP63：GLLGLGYGGYSGYGGYGGYGHGL-

LM-ACP64：GLLGLGYGGYGGYGGYGGYGHGL-

LM-ACP65：GLLGLGYGGYGGYGGYGGYGHL-

LM-ACP70：GYLGGY-

LM-ACP73：GYLGYY-

LM-ACP76：GYLGGY-

LM-ACP77：GLLLGGYGGYGGIGSYGGLGGYGGYGGYGGY-

在 6 种蛋白中富甘氨酸、亮氨酸和酪氨酸区以 GYLG-序列开始，长度不超过 6 个残基，在其他 4 个蛋白中以 GLLG 开始，达到 23～24 个残基，最后 1 个 LM-ACP77 以 GLLG 序列开始，有 34 个残基。

许多蝗虫成虫表皮蛋白是相似的。但是它们与果蝇富甘氨酸的依赖蜕皮酮的蛋白（EDG91）都无明显的同源性。富甘氨酸、亮氨酸与酪氨酸区昆虫卵壳蛋白中的富甘氨酸区和细胞角蛋白（cytokeratin）有相似之处。它们与美洲蜚蠊的卵囊蛋白也有明显的相似性。其中含有大量串连的 GYGGL 重复，都属随机排列（Pan 等，1986）。在蜘蛛丝中也有这种重复序列（Xu 和 Lewis，1990）。

在蛋白链中，脯氨酸和甘氨酸残基有很明显的折叠与弯曲趋势，富甘氨酸区可能形成蛋白质的折叠。研究发现，合成肽有选择 Boc-Gly-Vay-Gly-Gly-Leu-Met 的倾向（leij 等，1992）。分子折叠具有多样化和低能耗特征，使表皮构型中富柔软性。Ⅱ型 β-折叠只是一般多肽中的常态结构，即 Poly（X-Gly-Gly），X 是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸，也可能是 Poly（Len-Gly-Gly），至少有 4 种稳定的多聚体结构。

在富甘氨酸、亮氨酸和酪氨酸区中形成的 β-折叠可由氢键而得到稳定。亮氨酸和酪氨酸残基的支链与相邻的区域或分子中疏水的芳香基支链相互作用。这种伸展性较强的甘氨酸、亮氨酸、酪氨酸区存在于绿色草蛉（*Chrysopa flava*）分泌的蛋白丝的 β-垂直结构中。蛋白质丝的肽键折叠使丝的纵向很容易延伸，可拉长到原来长度的 5～6 倍，使原来与丝的纵轴垂直的肽链方向变为平行。

### 8.3 丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-丙氨酸/缬氨酸重复

在蝗虫预表皮纯化的蛋白内，含有很高的丙氨酸（30%～40%）。大多数丙氨酸都出

现在疏水区，常与重复的脯氨酸和缬氨酸残基在一起，形成 Ala-Ala-Pro-Ala/Val 主题（Hφjrup，et al，1986；Andersen et al，1993），而且在其他主题中，这 3 种氨基酸也比较多。AAPA/A 序列也出现在飞蝗的中龄若虫（Nφhr etla，1992）和黄粉甲及家蚕蛹的表皮蛋白中（Andersen，et al 1995，Nakato et al，1990）。果蝇的 1 种依赖蜕皮酮的基因产物（DM-EDG84）含 1 个单拷贝序列。在多声大蚕蛾（*Antheraea polyphemus*）卵壳蛋白中有这类主题。黄猩猩果蝇 dec-1，卵壳中定位产物含有 AAAAPVPAPAPA-PAAAPPPAPAPAADPPAAPVDAPQPA 的序列（Waring et al，1990），凡观察到 AAPA/V 序列的蛋白，都是结构蛋白。AAPA/V 对蛋白的折叠具有重要的作用，并由于氨基酸残基支链之间的疏水性和相互作用，从而增加表皮的弯曲性和延展性。另外，由脯氨酸残基产生的可调节空间，虽然脯氨酸残基部位于甘氨酸之后，也能使表皮蛋白肽链获得更多的弯曲性。如果所有弯曲是同方向的，就会形成不规则的螺旋结构，并可由丙氨酸和缬氨支链之间的疏水性作用而使结构得到稳定。在合成的环一双（V-P-A-V-G）十肽中具有脯氨酸-丙氨酸序列（Bhandary et al，1990），两个双弯曲甘氨酸-缬氨酸桥，多肽中成为聚（Val-Pro-Ala-Val-Gly）结构的弹性聚合物。

Muller 等（1993）曾经用 2DNMR 分光光度计技术和限制性分子动态模拟，研究了多种聚丙氨酰环肽。肽环（PAAPAA）在 DMSO 中聚合成 3 种不同构型（49% 全反，28% 二顺和 23% 不对称结构）在 3 种异构体之间有一个动态平衡，当脯氨酸后的残基被更大残基替代时，平衡移向顺式结构。

Ala-Ala-Pro-Ala 具有很强的折叠趋势，在结构中既有动态平衡，也存在低能量壁垒。当蛋白质中序列受外力作用时，引起螺旋构型发生变化，表皮得到伸缩性，一旦外力消失表皮蛋白很容易恢复常态，继续保持其结构的动态平衡。

## 8.4　表皮蛋白结构及其功能

表皮蛋白的氨基酸序列虽然不同类型中有许多差异，但很多相似性真正表明了它的同源性。说明它们具有共同的远古祖先。从 20 种蛋白质中 28 个残基的序列中可以看到其中并没有插入多少间隙区。在果蝇、烟草天蛾和蝗虫的表皮蛋白中是 xPTPPPxx；在家蚕和折翅蠊的表皮蛋白中是 DTPEVAxARAAHxAA。这些区域和成对的短区能够识别和结合几丁质和其他蛋白质组分。

28 个残基的亲水保守序列，无论软的和硬的表皮，或者蜕皮前和蜕皮后的蛋白中都有发现。这些蛋白的主要区别在于 N-和 C-末端的残基侧链上。在蝗虫蜕皮前的翅蛋白中，主题是 AAPA/V，黄粉甲的 2 种蜕皮前表皮蛋白（TM-ACP20 和 TM-ACP22）中主要是甘氨酸，但也有亮氨酸和缬氨酸。

幼虫的软表皮中的蛋白和含有中心亲水保守序列蛋白，在 N-和 C-末端的延伸区域主要也是亲水的，但含有伸展程度较弱的疏水氨基酸残基。它们通过折叠使蛋白质形成球形结构的疏水残基，隐藏在其内部，周围是亲水残基，使分子外侧与水接触。很多酸性或碱性残基能与水结合，使蛋白质有较高的含水量，表皮也因而变软，并能减弱相邻蛋白间的相互作用。根据 Vincent 和 Hillerton（1979）的测定，蛋白质脱水以后，就使表皮变硬。

富甘氨酸、酪氨酸和亮氨酸区和富丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸主题的重要性是使蛋白链

产生折叠。形成于蜕皮之前的蛋白，在序列中插入了很多间隙，肽链在两种主题上折叠。预蛋白中常常有脯氨酸残基，每6～8个残基便能改变全链的方向。蛋白质中含有疏水区的能使分子结构致密而趋向稳定，在链段之间插入疏水区则使分子内部具有一定的活动性。弹性蛋白β-螺旋结构也存在于蜕皮前的疏水表皮蛋白中，而折叠使表皮蛋白产生稳定性（Urry等，1974，1982）。

蜕皮前的表皮蛋白有1种强烈的聚集趋势。由于它们明显的疏水性，使水在蛋白之间的疏水接触区受到排斥，从而集中到亲水区周围。亲水区中水分经过浓集，被锁定在很小的空间，而该空间是分散在疏水的间质中的，于是在亲水区与疏水区之间形成相位分离(Phase-separation)。

## 第四节 表皮的鞣化和骨化

昆虫中最常见的鞣化是醌鞣化，其中包括O-醌与表皮蛋白的自由氨基成键结合。另一种则为β-鞣化，蛋白与醌在支链β-碳原子上交联。这两种鞣化剂前体都是N-乙酰多巴胺，它来源于酪氨酸。当酪氨酸在酪氨酸羟化酶作用下生成多巴以后，又被多巴脱羧酶脱羧为多巴胺，多巴胺被N-乙酰转移酶乙酰化为N-乙酰多巴胺。此外酪氨酸也可先转化为酪氨再形成多巴、N-乙酰多巴胺和N-乙酰酪胺。除了N-乙酰多巴胺外，也在昆虫中发现以β-丙氨酸为前体参与鞣化和骨化。

骨化或鞣化是动物蛋白质结构变性的复杂过程。在昆虫表皮通过其中的蛋白与醌反应完成骨化过程，使表皮变硬，并且获得高度的稳定性。如外表皮的形成，或卵壳和卵鞘的产生都包含蛋白质的骨化过程。

乙酰化儿茶酚胺在表皮骨化时以氧化态连接到表皮蛋白上，主要以组氨酸和赖氨酸残基与儿茶酚形成加合物（Schaefer et al，1987；Andersen et al，1992）。组氨酸和赖氨酸的支链被锁定在亲水的空间，表皮中大部分水在骨化作用发生时被排斥，并为芳香基部分所替代，从而使表皮中水的含量急剧减少。如蝗虫表皮在骨化后6h，含水量由43%下降到32%（Andersen，1981）。最后芳香基基质充塞所有空间，表皮硬度明显增加，形成蛋白交联和充满基质的硬表皮（Vincent and Hillerton，1979；Vincent，1980）。

蝗虫未骨化的预表皮是很柔软的，并略带弹性。在骨化以后就变得硬而不脆，能弯曲而破碎，不易恢复原形。不同的机械性质主要是由于水分的丧失和芳香基交联后骨化的结果。而小范围柔韧性是由蛋白分子内部的伸缩性造成的，但相互之间很难活动。因为脱水和芳香基的交联并在蛋白中充满了基质。在骨化的蝗虫表皮中，蛋白在有效的蛋白质溶剂中膨胀时（如纯酸中），这种膨胀虽然是可逆的，并产生很大的可塑性，但很难将蛋白抽提出来。

### 1 表皮蛋白的鞣化和骨化理论

醌鞣化理论是50年前建立的。表皮蛋白质通过同醌交联，从而使表皮变为坚硬、暗化而且不溶解的物质。根据现在的理论，酪氨酸的代谢产物-N-乙酰多巴胺由皮细胞分泌入表皮，同时与可利用的酰胺基或巯基相互作用。酰胺基与醌互作时，其中原子通过共价

键连接到芳香环上，同时醌被还原成邻苯二酚残基。邻苯二酚基团通过另1个游离醌分子可以被非酶反应重新氧化形成醌，并同第二个酰胺基互相作用。如果该酰胺基位于第二个蛋白质分子上，便又形成交联。与蛋白质键合的醌也能同更多的醌相互作用，从而形成多聚体。结合后的物质可能以氧化或还原状态终结，取决于分泌入表皮的二酚物质的量和作用基团的相对比例。离体试验表明，当蛋白质过剩时，结合的物质即以还原态的邻苯二酚形式出现，且颜色较浅；当形成的醌过量时，结合后的物质处于氧化状态，产物的颜色较深。根据 Hackman（1959）的观点，暗表皮和浅色鞣化表皮之间的差异可能是由于形成的醌数量不同所致。

由于表皮中蛋白质是固态存在的，通过酸水解进行质谱分析时，虽然已经明确鞣化剂是乙酰多巴胺等儿茶酚胺化合物，但对于蛋白质如何和儿茶酚胺类交联，始终没有搞清。据 Xu 等（1997）报道，利用联矩阵激光解析离子化质谱仪（IDH-NMR）和 ID 同型核子 Overbauser 效应核磁共振光谱仪技术对固体表皮进行了蛋白质交联分析，首次证明了儿茶酚胺和表皮蛋白质中组氨酰残基之间真实交联状态，获得了4种蛋白质交联的分子模型，在烟草天蛾蛹表皮中，试验结果表明，骨化作用不仅发生在儿茶酚的苯的 C6 上，而且也发生在侧链的 C7 上。表皮蛋白以其中的组氨酰残基与儿茶酚交联，但组氨酰中的咪唑氮（$N^{\tau}$ 和 $N^{\pi}$）的易位性，会产生1、4和1、5两种双取代咪唑。由此获得4种306u的同分异构体加合物，分别命名为 $6N^{\tau}$-His-Da、$6N^{\pi}$His-Da、$7N^{\tau}$-His-Da 和 $7N^{\pi}$-His-Da，它们之间的分子比为6:3:2:1。

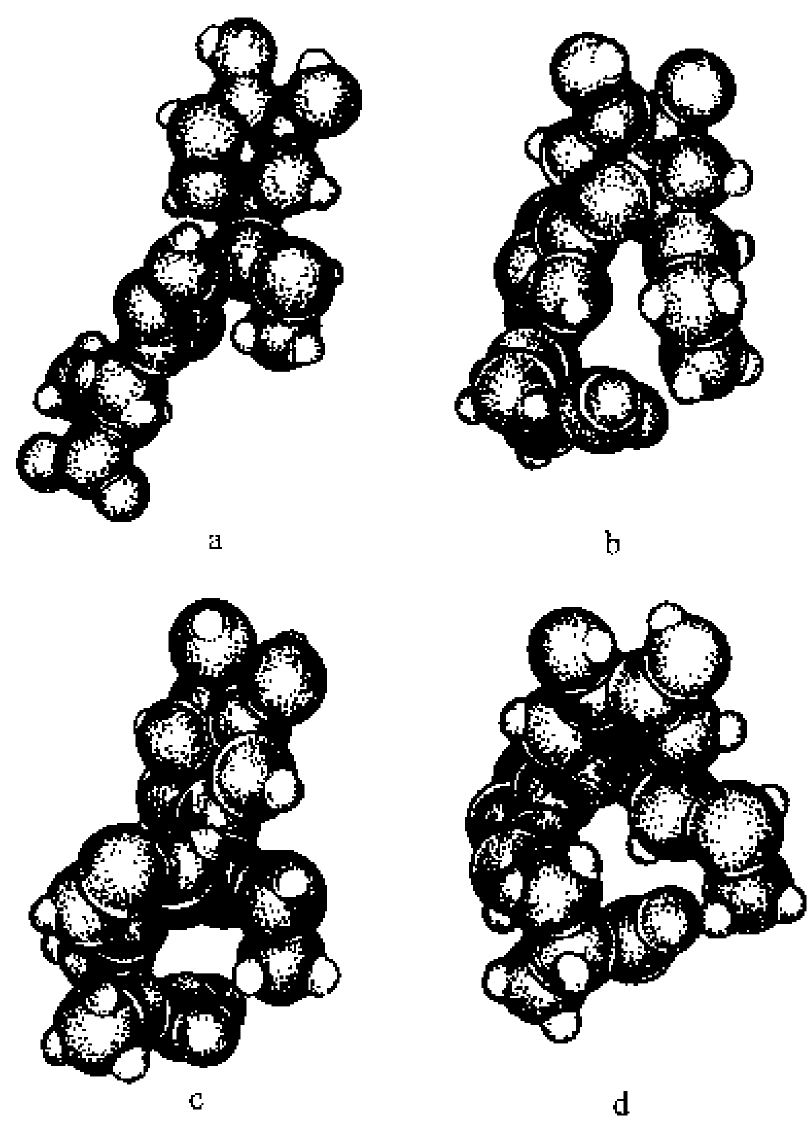



图 3-7 4种 His-Da 加合物的立体构型

a.7-$N^{\tau}$-His-Da b.6-$N^{\tau}$-His-Da

c.7-$N^{\pi}$-His-Da d.6-$N^{\pi}$-His-Da

b、c、d 结构内有分子静电作用，但 a 没有

（仿 Xu，1997）

根据 HNMR 分析 C6 加合物的最大吸收峰为284nm，而 C7（或β-）加合物的最大吸收峰为280nm。4种 His-Da 合加物的主体构型，见图3-7。

## 2 表皮的骨化剂和骨化过程

烟草天蛾蛹蜕下的表皮用固态 NMR 光谱分析，明确骨化作用中与表皮蛋白交联的儿茶酚胺主要是 N-乙酰多巴胺（NADA）N-β丙酰多巴胺（NBAD），这是最主要的骨化剂。在酚氧化酶的作用下，氧化为邻醌化合物，再使醌同分异构酶作用，转化为对醌甲基化合物。邻醌化合物接着与表皮蛋白中某些功能团（组胺酰残基）产生亲核加成反应（Ande-

rsen 等，1996）以共价键进行交联。在离体试验中发现，NADA 和 N-乙酰组氨酸反应时，在表皮酶制备物存在时，具有催化效应，交联产物见图 3-8。4 种交联蛋白在酸性溶液中水解成为 4 种加合物，即 6-$N^{\tau}$、6-$H^{\pi}$、7-$N^{\tau}$、7-$N^{\pi}$（图 3-8）。在水解产物中 C7 合加物大概是 C6 加合物的 2 倍，说明儿茶酚胺苯环上碳原子形成 C-N 键形成的产物超过支链上 C7

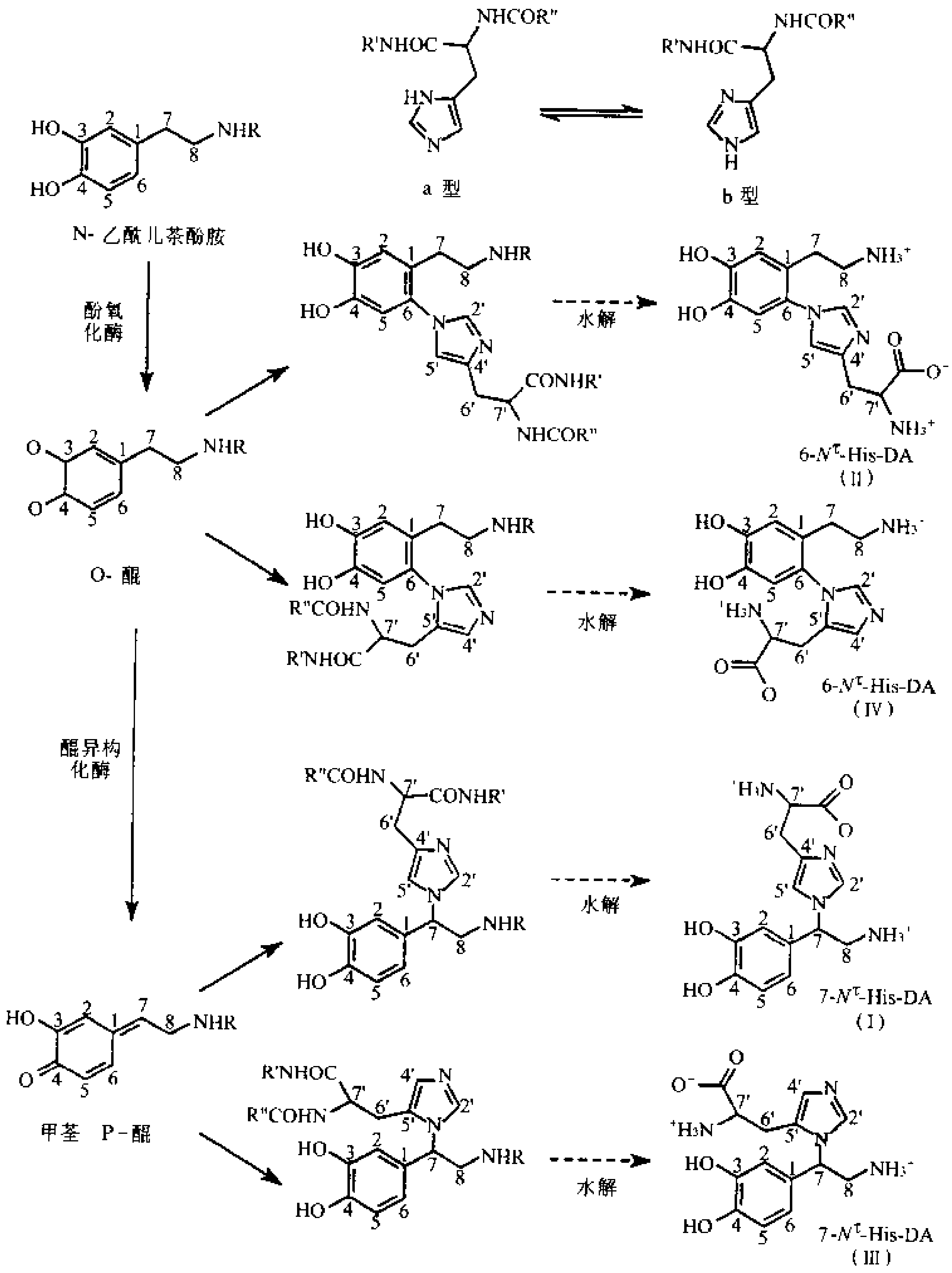



图 3-8 骨化剂 N-乙酰儿茶酚胺起始与蛋白质组氨酰残基之间的交联作用

（仿 Xu，1997）

的 C-N 键产物（Kramer 等 1995）。此外，在苯环上 C2 和 C5 也可能产生 C-N 交联。

## 3 鞣化和骨化的激素调控

昆虫表皮蛋白的鞣化和骨化首先受到蜕皮甾醇的调控。羽化激素的释放时间是由血淋巴中不断下降的蜕皮甾醇控制的。低浓度的 20-羟基蜕皮酮使靶组织对羽化激素的敏感性得到提高。羽化激素参与许多蜕皮有关的过程，其中包括肌肉和神经元的退化，对旧表皮的消化和黑色素的产生都十分重要，并能激发鞣化激素作用于心脏的神经肽（CAP）。

鞣化和骨化大都发生在昆虫羽化之后，在许多昆虫中已经证明，鞣化激素的释放依赖于感觉输入，传入大脑的神经冲动是引发鞣化激素的主要信号。另外，如果昆虫被迫在沙土中挖掘一定时间，就会延迟刚羽化的天蛾或家蝇表皮的鞣化。因为烟草天蛾只有寻找到合适的展翅场所，才能激发鞣化激素的释放。对蜚蠊来说，诱发鞣化激素的刺激物来自胸部表皮的蜕皮裂缝。迄今为止，已在 6 种昆虫体内测到鞣化激素。它们存在于中枢神经系统中，心侧体和神经节内，在麻蝇体内腹部含量高于脑部 6 倍之多，而在烟草天蛾的预成虫中，含量特别丰富；在蜚蠊腹部末端神经节上也富含鞣化激素。在麻蝇中，鞣化激素大多由腹部第 1 节的神经分泌细胞分泌，然后进入咽侧体和腹神经索，再由神经血器官进入血淋巴。

在被研究过的昆虫体内，鞣化激素是在蜕皮前开始合成的，但仅在羽化过程或刚羽化之后才快速、大量合成。合成速度与持续时间与表皮鞣化或骨化进程有关。如黄粉甲蛹的表皮骨化时间很长，它的合成和分泌时间也长。在家蝇、麻蝇或丽蝇中，鞣化激素出现在羽化后或找到伸展虫体合适场所的 3～5min 内，当时血淋巴中浓度开始升高，关键时间大约为 5min 左右，30min 后血淋巴中激素含量即告消失。羽化后 80min 完成表皮鞣化。

在蛹的血淋巴中，还有许多与鞣化有关的因子，如前伸缩因子（ARF）、蛹壳鞣化因子（PTF）、蛹化稳定因子（PIF）、蛹壳刺激因子（PSF）等。

Coffrell、Fraenkel 和 Hsiao 等对麻蝇的表皮鞣化、Lake、Mills 和 Wielsen 对蜚蠊的鞣化激素都做过大量研究。蜚蠊和麻蝇的鞣化激素是一种具阳离子特性的蛋白，分子量（38～40）$\times 10^3$u，而烟草天蛾的为（20～30）$\times 10^3$u。ARF 的分子量大到 $300\times 10^3$u，在中枢神经中含有 4 个 $80\times 10^3$u 的亚单位，而在血淋巴中含两个 $26\times 10^3$u 的亚单位。鞣化激素和其他有关因子如 ARF 都具有热稳定性，PTF 在中枢神经系统中是热稳定的，但在血淋巴中则是热不稳定的。

鞣化激素和羽化激素都通过 cAMP 的第二信使控制表皮的骨化。Seligman 和 Delachanbre 证明，cAMP 能激活酪氨酸羟化酶的形成，加快酪氨酸转化为多巴。但据 Compton 和 Mills（1982）的研究，在蜚蠊中鞣化激素激活血细胞的胞膜腺苷酸环化酶，因此，激发 cAMP 的合成，从而增加血细胞膜对酪氨酸的透性，促使酪氨酸穿过细胞膜，并与血细胞中酪氨酸脱羧酶作用，加速酪氨酸转化为酪氨，进一步成为多巴胺。

在麻蝇中 PTF 也能通过 cAMP 发生作用，但是 ARF 的作用似乎同 cAMP 无关 注射 cAMP 能诱发表皮提前鞣化，使酪氨酸结合到表皮上。通过注射儿茶酚胺能促进鞣化，阻

止 cAMP 的破坏。放线菌酮具有抑制 RNA 和蛋白质的合成。单独使用放线菌酮或结合 cAMP 或以神经激素试验，证明 PTF 能加速鞣化所需的 RNA 的转录，而 cAMP 能激活这一过程。该过程依赖于基因转录产物，也就是说基因转录的激活依赖于 PTF。总之，羽化激素、鞣化激素、ARF、PIF 和 PTF 都在特定时期的血淋巴中出现，它们在表皮鞣化过程中起到了非常重要的作用，但最终还受蜕皮甾醇的调控，有关蜕皮甾醇的详细功能，请参看第十二章。

# 第四章 昆虫的贮存蛋白

昆虫的贮存蛋白是一类特异性血淋巴蛋白。这类蛋白在幼虫或若虫期的脂肪体内合成后释入血淋巴中，化蛹时又由脂肪体摄取，在细胞内形成蛋白颗粒，当再次进入血淋巴时，为成虫器官发育和新组织的形成提供蛋白质和氨基酸。

贮存蛋白的种类较多，结构复杂，与卵黄蛋白和其他血淋巴蛋白都有密切的关系。

早在 1934 年 Lauffer 就从家蚕血淋巴中发现了一类分子量为 $500\times10^3$u 的蛋白质，一直到 1967 年以后，Munn 等才开始在红头丽蝇（*Calliphora vicina*）中分离并鉴定出一种特异性蛋白，称为丽蝇蛋白（calliphorin）（Munn and Grevill，1969），后来被命名为幼虫贮存蛋白Ⅰ（LSPI）。后又分离到另一种幼虫贮存蛋白Ⅱ（LSPⅡ）（Roberts and Brock，1981）。丽蝇蛋白在全变态昆虫的幼虫期大量合成，在成虫期则缺少。在澳大利亚丽蝇（*C. stygia*）中 Kinnear 于 1973 年获得两种幼虫血淋巴蛋白，分别称为蛋白质 B 与 C。

在鳞翅目昆虫体内，1968 年由 Locke 和 Collins 在大芭蕉弄蝶（*Calpodes ethlius*）中测定到血淋巴内存在一种贮存蛋白。1978 年 Tojo 等在惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）中发现了贮存蛋白，Telfer 等于 1983 年对此进行了分离鉴定，由于其中芳香基氨基酸含量很高，因此称之为芳香（基）蛋白(arylphorin)，并指出是一种含糖基的六聚体结构，以后 Tojo 和 Nagata 等（1980）在家蚕（*Bombyx mori*）中重新发现了分子量 $500\times10^3$u 的贮存蛋白。根据亚单位的数量，提出了六聚蛋白(hexameric protein）这一名称，Haunerland and Bowers（1986）对双翅目的贮存蛋白开展了进一步的研究。此后贮存蛋白的研究不但对象逐步扩大，并且进入到了分子水平，多种贮存蛋白进行

纯化、克隆和测序。

在将近半个世纪中，人们已经在蜚蠊目、直翅目、双翅目、鳞翅目和膜翅目中20多种昆虫内分离和鉴定了贮存蛋白。研究者从不同角度给予种种名称，如幼虫贮存蛋白(larval storage protein LSP)、幼虫血淋巴蛋白（larval haemolymphprotein LHP)、幼虫血清蛋白（larval serum protein，LSP)。并根据发现的先后编号为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ号或A、B、C等。同时，也有以昆虫名称来命名的，如丽蝇蛋白（calliphorin)、伏蝇蛋白（phorinin)、绿蝇蛋白（lucilin）和家蚕蛋白（bombyxin)，还有以结构和组分命名的，如芳香蛋白(arylphorin)、高甲硫氨酸蛋白（high-methionine protein）或富甲硫氨酸蛋白（methionine-rich protein）等等。本文在综述以往研究报道时，大多采用作者原用的名称，一般则统称为贮存蛋白。

1984年Roberts与Levenbook先后提出贮存蛋白（storage protein）这一名称，指出各类昆虫中存在2～3种贮存蛋白。它们由取食期的幼虫脂肪体合成，然后释放到血淋巴中，在末龄幼虫期达到顶峰，取食停止后又由脂肪体选择性地摄取，形成贮藏蛋白颗粒，供昆虫蜕皮变态时形成新组织用。由此形成了贮存蛋白概念，而区别于一般血淋巴蛋白。

# 第一节 贮存蛋白的结构和理化特性

## 1 分子量和亚单位

Munn等在1971年发现红头丽蝇贮存蛋白（即丽蝇蛋白)，是1种由6个亚单位聚合成的球形六聚体蛋白，分子量约$500\times10^3$u，各亚单位的分子量为$85\times10^3$u，以后发现多在（66～85）$\times10^3$u范围内（图4-1)。

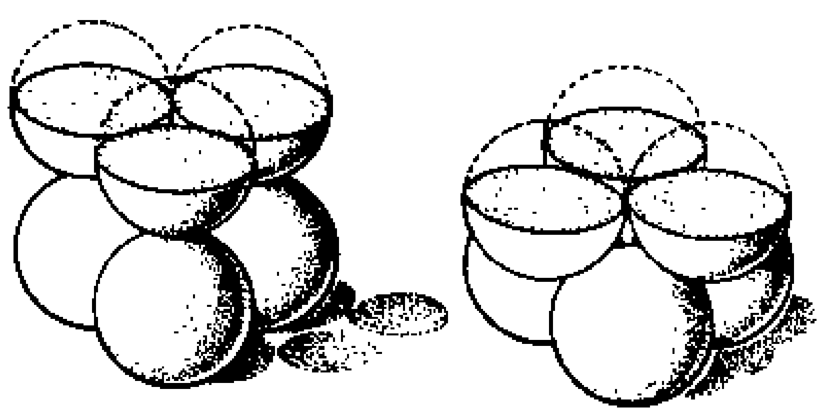


图4-1 昆虫贮存蛋白的六聚体构型
（仿Munn等，1971）

Levenbook人等利用PAGE、凝胶过滤、超速离心和蔗糖密度梯度离心等多种技术对双翅目昆虫的贮存蛋白的分子量和亚单位进行分离测定。早期发现贮存蛋白结构由于操作时的pH不同而异，因而分子量变化很大（表4-1)。

表4-1 PAGE pH值与丽蝇蛋白的分子量和推导的亚单位数

| pH | 平均分子量（$1\times10^3$u) | 亚单位数 |
|---|---|---|
| 6.5 | 495（±30) | 6 |
| 7.5 | 293（±50) | 5 |
| 8.0 | 238（±68) | 4 |
| 8.5 | 137（±21) | 2 |
| 9.5 | 86（±6) | 1 |

贮存蛋白在高pH时的解离，容易与SDS-PAGE条件下的解离相混淆。在碱性条件

下，解离的亚单位在分子量和电荷两方面都有差别，因此迁移率的变化较为复杂。但在 SDS-PAGE 时所得的亚单位不含负电荷，其分子量能直接反映亚单位的实际情况。因此，同样是红头丽蝇的贮存蛋白 LHP-1，在 pH8.6 时 PAGE 中出现 6 个谱带，即为 6 个分子量相同而电荷不同的亚单位形成的谱带，但在 SDS-PAGE 中不带负电荷，因此，仅出现一个谱带。

通过对贮存蛋白解离和未解离的亚单位分子量的分析，明确了不同种昆虫的贮存蛋白以及不同亚单位之间的细微差别。Roberts 证明黄猩猩果蝇的 LHP-Ⅰ和 LHP-Ⅱ在 pH9 时都能可逆性解离成二聚体，通过 SDS 电泳，LHP-Ⅰ可解离出 α、β 和 γ 3 种二聚体，但 LHP-Ⅱ仅出现单一谱带；在 pH8.6 时，黄猩猩果蝇的贮存蛋白有 5 个 PAGE 谱带，两个有相同的免疫学特性，将 5 个谱带切下，在 SDS-PAGE 上重新电泳，出现两个分子量分别为 82 和 $84\times10^3$u 的 α 和 β 多肽。LHP-Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ大多由 α 多肽组成的，LHPⅣ含有 α 和 β 多肽，而 LHP-Ⅴ由 α、β 和其他多肽组成。

贮存蛋白内部各亚单位之间的结合是一个饶有兴趣的问题。Zomer 和 Levenbook（1979）曾用特殊的氨基酸修饰 LHP-Ⅰ，暂时的可逆乙酰化能修饰酪氨酸羧基总量的 10%～20%，引起六聚体部分解聚，出现亚单位数量不同的聚合物。在亚单位间由酪氨酸羧基产生乙酰化，并随乙酰化程度的不同，形成二聚体或者三聚体，而很少修饰的亚单位，含有较高比例的羟基自由基，就形成较大的聚合体。若将乙酰化时间延长，使更多的酪氨酸和赖氨酸等氨基酸被修饰，就产生完全不可逆的解聚。光谱学研究表明，每个亚单位约有 10 个色氨酸，其中 9 个被包埋在多肽分子内，也就是说在六聚体或亚单位上只有一个色氨酸是暴露的。

在 pH7.5～8.0 时 LHP-Ⅰ聚合体往往呈半解聚状态。根据 LHP 中色氨酸和赖氨酸组分的特点，可用紫外吸收光谱进行研究。Munn 等（1971）曾在 pH6.3 时测得 LHP-Ⅰ的 A280nm/A250nm 比值较大，在 pH3.0～3.5 条件下，A280nm＝1 226。已知 α-螺旋和折叠是其三级结构。在 pH6.5 时，LHP-Ⅰ的六聚体约含 12%的 α-螺旋、14%的 β-折叠和 74%的随机结构。因此形成比较稳定的六聚体。

降低 pH 或反应温度，或增加钙离子的浓度都能增强亚单位之间的结合力。疏水性在亚单位之间并不是主要动力，已知弱疏水键（如脂肪酸和非离子型或两性表面活性剂）很少或完全不影响亚单位的聚合或解聚。

血淋巴中的 LHP 和脂肪体中的有明显的差异。如惜古比天蚕蛾两种组织中的 LHP-Ⅱ有不同的氨基酸组分，血淋巴中 LHP-Ⅲ甚至不与脂肪体中的发生交叉免疫反应，它可能在脂肪体中转化为 LHP-Ⅰ或 LHP-Ⅱ，从而蛋白质结构出现重大的修饰。Martin 等（1971）曾经观察到，血淋巴中蛋白质在乙醇中溶解度达 95%（V/V），而脂肪体中的蛋白质则是不溶解的。在 pH8.2 下，脂肪体 LHP 的 PAGE 谱带呈单一的狭带，而血淋巴中是一个迁移率较小的单一宽带。

Korochkina 等（1997）利用免疫技术和电泳谱带，计算了 7 种双翅目昆虫 3 种六聚蛋白的（66～85）$\times10^3$u 亚单位分子。根据血清学与聚丙酰氨凝胶电泳，分析了双翅目昆虫六聚蛋白的亚单位氨基酸组分，在伊蚊中分离到 AaHex1 和 AaHex2 两种亚单位，在按蚊中相应的分离到 AaHex1 和 AaHex2，分子量范围（66～85）$\times10^3$u，它们与丽蝇蛋白

LSP1 和 LSP2 比较，氨基酸组分如表 4-2。

表 4-2 蚊类贮存蛋白亚单位的氨基酸组分（mol%）

| Residue | AaHex1 | AaHex2 | Calliphorin[a] | LSP 1β[b] | LSP2 | LSP2[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Asp | — | — | 7.39 | 6.72 | — | 6.68 |
| Glu | — | — | 6.73 | 6.59 | — | 6.40 |
| Asn | — | — | 4.35 | 4.56 | — | 4.73 |
| Gln | — | — | 1.98 | 2.79 | — | 3.89 |
| ASX | 12.15 | 10.31 | — | — | 13.20 | — |
| GLX | 9.74 | 10.83 | — | — | 9.40 | — |
| Ser | 3.84 | 5.80 | 4.35 | 3.80 | 5.39 | 4.73 |
| Gly | 7.63 | 10.97 | 5.28 | 4.69 | 8.84 | 5.42 |
| His | 3.22 | 1.93 | 3.17 | 2.66 | 5.43 | 7.51 |
| Arg | 3.59 | 3.66 | 3.56 | 3.17 | 4.30 | 3.76 |
| Thr | 4.51 | 4.31 | 5.01 | 4.44 | 3.58 | 4.03 |
| Ala | 6.06 | 6.39 | 3.03 | 5.45 | 5.70 | 4.87 |
| Pro | 4.92 | 4.86 | 3.03 | 3.04 | 4.21 | 3.89 |
| Tyr | 8.32 | 6.20 | 10.82 | 10.77 | 6.53 | 7.93 |
| Val | 9.99 | 6.95 | 5.81 | 4.56 | 8.28 | 8.48 |
| Met | 1.29 | 1.76 | 4.35 | 7.10 | 1.84 | 2.78 |
| Ile | 3.99 | 4.94 | 5.28 | 4.06 | 3.13 | 3.34 |
| Leu | 8.45 | 8.39 | 6.20 | 6.59 | 7.74 | 6.54 |
| Phe | 6.53 | 7.31 | 10.29 | 9.13 | 7.12 | 7.09 |
| Lys | 5.76 | 5.30 | 7.65 | 7.22 | 5.32 | 5.29 |
| Trp | — | — | 1.45 | 2.16 | — | 2.23 |
| Cys | — | — | 0.26 | 0.51 | — | 0.28 |

a. 根据蛋白编码序列推算（Naumann 和 Scheller，1991）b. 根据 Massey 等材料（个人通讯）c. 根据蛋白编码序列推算（Mousseron，1986）（录自 Koruchkina et al，1997）

从表 4-2 中可以看出多肽分析和由核酸序列推导的氨基酸组分无明显差异。伊蚊主要的六聚蛋白亚单位 AaHex1 和 AaHex2 的苯丙氨酸加酪氨酸的含量分别为 14.85% 与 13.5%，类似于 LSP2，而不同于丽蝇蛋白和 LSP1。此外，甲硫氨酸和赖氨酸含量也与 LSP2 接近，仅组氨酸含量丽蝇蛋白和 LSP1 的相似程度超过 LSP2。在两种伊蚊六聚蛋白亚单位之间，Hex1 中组氨酸、芳基氨基酸与疏水残基（Leu + Val + Ile）含量都略高于 Hex2。AaHex1 或 AaHex2 和按蚊的六聚蛋白亚单位 AgHex2 相比，由于 AgHex1 与 AgHex2 很难分离纯化，至今尚未获得有价值的资料。从已有数据看，两种伊蚊蛋白和 AgHex2 很相似，含有许多昆虫中常见的芳香蛋白的典型主题，序列又与血蓝蛋白相似（Hazes & Hol，1992，Beintema 等，1994）。图 4-2 比较了 AaHex1、2 和丽蝇蛋白等的 N-末端序列，从中可以看出它们之间的典型特征和保守程度。

从序列分析判断，AaHex1 与 AaHex2 有一个潜在的 N-键糖基化点，和某些鳞翅目昆虫的芳香蛋白和果蝇的 LSP2 亚单位一样，都是比较保守的。

利用梯度电泳和双向电泳，将各亚单位分离，获得埃及伊蚊和冈比亚按蚊六聚蛋白亚单位的分子量如下：

A.aegypti AaHex1 $85\times10^3$u A.gambiae AaHex1 $82\times10^3$u

AaHex1 埃及伊蚊六聚蛋白1　Y V V V P E D K I T Y A D K D F L V K Q K Q L L
(cagaatt) CAGAAGATAAGATTACTTATGC
C C C

AaHex2 埃及伊蚊六聚蛋白2　T K D V K Y G D E I F L K K Q K A I L
(cagaattc) ACTAAGGATGTTAAGTATGG
C A C

AgHex2 冈比亚伊蚊六聚蛋白2　Y V V V P E G K V T Y A D

LSP2 幼虫贮存蛋白2　L G Q A K H L D S K V A D K D F L M K Q K F M Y Q

LSP1β 幼虫贮存蛋白1β　A S F H Q T H E V K I A D K D F L M K Q K F L F E

Calliph 丽蝇蛋白　A S S I S K H E V K I A D K D F L A K Q K F L F E

图 4-2 双翅目六聚蛋白和亚单位的 N-末端序列比较

埃及伊蚊 AaHex1、AaHex2 和冈比亚按蚊 AaHex2、LSP2 和 LSP1β 的比较（Oelaney 等，1986），黑体字示 6 种亚单位相同的氨基酸，序列中斜黑体表示伊蚊与按蚊相同的，单上线示双翅目类芳香蛋白类典型主题，双下线表示为 AaHex2 设计引物的序列，单下线表示每个引物的 EcoR1 位点（录自 Korchkina et al.，1997）.

AaHex2　$79\times10^3$u　　AaHex2/3　$77\times10^3$u

AaHex3　$70\times10^3$u

## 2 理化特性

### 2.1 物理性质

Munn 等最早报道了丽蝇蛋白的流体动力学性质。在 pH6.3 时，沉降系数（sedimentation coefficient）为 19.4s，而在 pH8.6 时，仅 7s，可以看出 pH 对沉降有很大的影响。丽蝇蛋白的扩散系数（diffusion coefficient）为 $3.26\times10^{-7}cm^2\cdot s^{-1}$，这些参数都反映了蛋白质的浓度关系。根据计算，贮存蛋白摩擦率 $f/f^0$ 为 1.216，说明它是一种结构均称的球形分子。

对双翅目昆虫的 LHP-Ⅰ（即丽蝇蛋白），不溶于蒸馏水，可溶于稀盐溶液中，如氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠、磷酸等以及 Tris 缓冲液中。LHP-Ⅰ在稀盐溶液中，4℃时呈现不稳定特性，在 pH6.3～6.8 的 50mM 的磷酸缓冲液中，几天后 LHP-Ⅰ会变成纤维或丝状聚合物，3～8 周后发生分解反应。在 SDS-PAGE 上出现 6～7 个低分子量片段谱带，各种蛋白水解酶抑制剂也无法抑制分解；高盐浓度能提高 LHP-Ⅰ的稳定性。在 70%饱和度的硫酸铵溶液中，在 4℃下至少能使其稳定性维持 1 年之久。

LHP-Ⅰ还有一个特性是在 SDS 煮沸时的不稳定性。在 100℃条件下与 1%的 SDS 溶液保持 4～5min，就会分解出许多小分子物质，形成 7～8 个降解片段，表明分子内部特

殊的非共价键发生断裂。LHP-Ⅰ仅溶于特定浓度的脲中，在1～9M浓度的脲中，或将胍基盐酸浓度提高到3M时，都表现出不溶解性。尽管如此，LHP能很好地溶于4M或>4M的胍基盐酸溶液中，此时蛋白质变性，不再溶于含水的缓冲液中。在6M胍基盐酸溶液中，pH8.6时可获得$87\times10^3$u的亚单位，只有在pH6.3时，可获得$528\times10^3$u的聚合体。

前人报道红头丽蝇（*C. vicina*）和澳大利亚丽蝇（*C. stygia*）的丽蝇蛋白是相同的。它们具有相同的电泳迁移率、氨基酸组分和免疫特性。但是Kinnear等（1975）发现澳大利亚丽蝇的贮存蛋白在PAGE上分子量仅$250\times10^3$u，因此考虑到电泳条件的影响，结果发现在0.02M磷酸缓冲液中，pH7.3时，贮存蛋白仅1条迁移带，分子量大约$250\times10^3$u，表现出三聚体结构特性，而在0.08M的tris缓冲液中都得到6条迁移带，说明它们仍属六聚体结构。

## 2.2 化学组成

在鳞翅目昆虫中，据Kramer等（1980）对烟草天蛾的研究，贮存蛋白分子量$450\times10^3$u是一种富含芳香基氨基酸的六聚体糖蛋白，与丽蝇蛋白不同，它在SDS的缓冲液中不解离。Telfer（1983）用SDS-PAGE电泳表明，亚单位分子量为72和$77\times10^3$u，小于Kramer早期判断的，原因是亚单位虽然都是具有同源性的糖蛋白，但有不同的末端序列。在惜古比天蚕蛾蛹中，Toja（1978）和Telfer，（1983）曾分离到两种贮存蛋白颗粒，由$77\times10^3$u的亚单位聚合而成。表4-3中列举了几种贮存蛋白分子量和辅基。

**表4-3 鳞翅目和双翅目贮存蛋白的比较**

| 来 源 | 分子量（亚单位）（$1\times10^3$u） | 糖（%） | 脂（%） | 芳香氨基酸（%） | 文 献 |
|---|---|---|---|---|---|
| 烟草天蛾 | 450（77，72） | 甘露糖2.5<br>葡糖胺1.1 | 2 | 苯丙氨酸9.1<br>酪氨酸10.6<br>色氨酸2.3 | Kramer等（1980） |
| 惜古比天蚕蛾 | 400（77） | 甘露糖3.5<br>葡糖胺0.7 | — | 苯丙氨酸8.6<br>酪氨酸9.1<br>色氨酸9.1 | Telfer等（1983） |
| 家蚕 | 500（88，83） | — | — | 苯丙氨酸9.8<br>酪氨酸8.9<br>色氨酸8.9 | Tojo等（1980） |
| 红头丽蝇 | 528（87） | 0.4～0.5 | — | 苯丙氨酸11.1<br>酪氨酸13.6<br>色氨酸2.2 | Munn等（1971） |

鳞翅目的芳香蛋白和双翅目的丽蝇蛋白

从表4-3中可以看出贮存蛋白作为糖蛋白，又含极少量的脂，都富含芳香族氨基酸，这是鳞翅目和双翅目昆虫主要贮存蛋白的共同特征。

在早期的贮存蛋白研究中，通过对12种昆虫贮存蛋白的氨基酸分析，发现了它们的氨基酸组分中天冬氨酸（包括天冬酰氨胺）含量最高，其次是谷氨酸（包括谷氨酰胺）。有些贮存蛋白含有较多的苯丙氨酸或酪氨酸，两者含量高达15%（W/W）左右。胱氨酸和色氨酸缺乏或痕量，在家蚕中，含有较多的甲硫氨酸（平均2.8%，高的达4%）。

Telfer（1991）对 12 种昆虫 41 种贮存蛋白的氨基酸组分进行了综合，并和 9 种节肢动物蛋白的组分进行比较，从中可以看出它们之间的相似性。

除氨基酸以外，贮存蛋白含有 0.4%～0.5%的糖类，在 LHP-Ⅱ中比例高达 3%～3.5%，个别高达 19%。这些糖类主要由甘露糖和氨基葡萄糖所组成，两者分子比为 5:2。在贮存蛋白的水解产物中，仅少量 N-乙酰葡萄糖胺。

多数贮存蛋白含有脂类，在烟草天蛾中含量高达 2%，但黄猩猩果蝇的贮存蛋白中则缺少。薄层分析和气相色谱分析表明，脂类中磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱和鞘磷脂的含量大体相等，并与甘油一酯和甘油二酯相结合，而甘油三酯和胆甾醇的量极微。

X-射线荧光光谱分析表明，贮存蛋白 LHP-Ⅰ和 LHP-Ⅱ中分别含有 0.095% 和 0.195%（W/W）的钙。原子吸收光谱也证明两者各含有 0.05% 和 0.18% 钙，而无镁、锌、锰、镍、钴或铜。在 LHP-Ⅰ中钙的结合比较牢固，不易被螯合剂除去，但 LHP-Ⅱ中的钙移去比较容易，可造成蛋白质的不可逆解离。

对于大多数贮存蛋白质来说，简单的氨基酸已不再是研究重点。而以芳香基蛋白和甲硫氨基酸蛋白的多少来进行分类和比较，并以此考察它们的功能。随着分子生物学的发展，近年来又将重点移到核酸和氨基酸的序列上，这将在后面作专门介绍。

## 第二节 贮存蛋白的分类

Telfer 和 Kunkel（1991）根据贮存蛋白中芳香基氨基酸、甲硫氨酸等重要氨基酸组分和蛋白质的亚单位，二级以至三级结构特点，综合各方面研究结果，把贮存蛋白分为芳香蛋白、富甲硫氨酸蛋白，双翅目 LSP-2 等多种。

### 1 芳香蛋白

King 和 Jukes 提出，芳香蛋白是典型的六聚体结构的贮存蛋白，其特点是酪氨酸和苯丙氨酸的含量很高。由于首先是从红头丽蝇幼虫（*Calliphora erythrocephala* *）中分离到的，因此称为 LSP1 或丽蝇蛋白（calliphorin）。它在倒数第 2 龄或末龄幼虫脂肪体内合成，分泌进入血淋巴，至幼虫取食末期，在血淋巴中的浓度达到高峰，占昆虫体内可溶性蛋白的 60%，到漫行期停止合成，以后逐渐由脂肪体吸收，形成蛋白颗粒，贮存到变态期，降解为氨基酸，参与新表皮的形成。从丽蝇蛋白抗原的相似性证实，环裂亚目和短角亚目中具有同源关系，但与长角亚目的贮存蛋白有明显的差异。

在双翅目中，除芳香族氨基酸含量超过 15%以外，甲硫氨酸含量常高达 4%以上，其功能被视为芳香基氨基酸的载体，或新表皮的氨基酸的贮存库。

在鳞翅目幼虫中发现血淋巴蛋白的 LHP1 含芳香基氨基酸很高，因此首先被命名为芳香蛋白（arylphorin）。它和双翅目的 LSP1 不同，甲硫氨酸的含量较少，而精氨酸含量很高。芳香蛋白已经在家蚕、大蜡螟、烟草天蛾等多种鳞翅目昆虫的贮存蛋白中得到纯化和测定，明确了它们的氨基酸序列，种间有 50%～70%的相似性，与双翅目的相异颇多。

---

* 即 *C. vicina*

它的发育特征与丽蝇蛋白相似，在末龄幼虫期以很高的速率合成，并随即释入血淋巴中，在漫行期结束，至蛹期又进入脂肪体内形成蛋白颗粒，在成虫期全部分解出多种氨基酸，部分参与卵黄蛋白的合成，而主要功能是参与表皮的形成。

此外，在直翅目、蜚蠊目和鞘翅目中均有芳香蛋白。黄粉甲和马铃薯甲虫的芳香蛋白也已完成测序，发现各目之间存在明显的同源性。

## 2 富甲硫氨酸蛋白

这一类鳞翅目贮存蛋白特点是甲硫氨酸含量超过4%，而芳香族氨基酸的含量较低，不存在糖基化，发生时间较芳香蛋白迟，到末龄幼虫期结束才开始合成，释入血淋巴后由于脂肪体的快速摄取，所以血淋巴中浓度常低于芳香蛋白和其他贮存蛋白。

富甲硫氨酸蛋白是一类性二型六聚体蛋白，在某些种类中，雄虫体内含量极微，在雌虫体内作为卵黄蛋白和新组织形成的氨基酸库。在月虹天蚕（*Tropacea luna*）中雄蛹含量明显低于雌蛹。在烟草天蛾和惜古比天蚕蛾中发现有2种或2种以上的异构体，但在舞毒蛾（*Lymautria dispar*）和海灰翅夜蛾（*Spodoptera litrua*）中却没有发现这类贮存蛋白。在印度谷螟（*Plodia interpunctella*）中还发现有独特的氨基酸组分的$70\times10^3$u亚单位，其天然蛋白不是六聚体结构。在不同类的富甲硫氨酸贮存蛋白之间有高度相关性，同源性44%～70%。相反，鳞翅目与双翅目之间相同性小于34%。在粉纹夜蛾中有两种与其他鳞目昆虫的富甲硫氨酸贮存蛋白相同的蛋白，它们都在末龄幼虫期受保幼激素的抑制，只在保幼激素滴度下降时期出现，因此，有时也将它们归入保幼激素抑制蛋白类中。

## 3 双翅目 LSP-2

这是双翅目中继芳香蛋白（或称 LSP-1）之后发现的又一种芳香蛋白。其中芳香基氨基酸和甲硫氨酸的含量较 LSP-1 少。与芳香蛋白有相似的发育轮廓，虽然也由脂肪体摄取，但最终归宿还不十分清楚。Denes 等（1990）认为，它在成虫蜕皮以后其基因能重新表达，故有持续性贮存蛋白的性质。在黄猩猩果蝇中，它的基因已经完成测序，发现与双翅目芳香蛋白的具有同源性。但也有人认为 LSP-2 不同于其他六聚体蛋白，进化关系上有一定的独立性。

在高等双翅目昆虫中，LSP-1 与 LSP-2 型的亚单位明显地形成不同的六聚体。在埃及伊蚊和冈比亚按蚊中，表现出混合的异质六聚体组分，无类似 LSP-2 的同源六聚体，也没有类似丽蝇蛋白的六聚体蛋白。

## 4 其他有关的贮存蛋白

### 4.1 保幼激素抑制蛋白（juvenile hormone-suppressible proteins）

在鳞翅目中出现于末龄幼虫期，当 JH 滴度下降和抑制作用消失时，该蛋白的基因开始表达。Jones（1990）在粉纹夜蛾中已分离提纯和测序。这是一类受 JH 抑制的酸性六聚体蛋白。同类之间同源性很高，但和其他六聚体蛋白缺少同源性。与富甲硫氨酸蛋白有很多相似之处。在烟草夜蛾中筛选了 cDNA 文库并进行了克隆。Memme 等（1994）在大蜡

螟中也克隆了这类六聚体蛋白（LSP-82），但是，发育特征与功能还不十分清楚。

### 4.2 核黄素结合蛋白（riboflavin-binding proteins）

Magee 等（1994）发现于惜古比天蚕蛾、大蜡螟和烟草夜蛾中。它们与其他六聚体贮存蛋白在结构上有许多相似之处，但不是真正的贮存蛋白，只在末龄幼虫期表达，在化蛹前并不迅速消失，也不积贮在蛹的脂肪体中，在羽化蜕皮时血淋巴中的浓度迅速降低，是否由于简单的水解或被脂肪体、卵巢或其他组织摄取，还不十分清楚。这类蛋白都是糖基化的，含有大量组氨酸和精氨酸。

### 4.3 极高密度脂蛋白（very high density lpoprotein）

极高密度脂蛋白（VHDL）已在烟草夜蛾等夜蛾类昆虫中得到定性，是 1 种非六聚体贮存蛋白。Haunerland 等（1986）指出，它是 $150\times10^3$u 的二聚体，由于与胆绿素（biliverdin）非共价键结合成四聚体，故具蓝色，含脂量达 10%，在末龄幼虫期合成。半翅目昆虫猎蝽体内也存在这类贮存蛋白。在末龄幼虫期，在脂肪体中合成，在血淋巴中积累的浓度很高，化蛹前由围脏脂肪体前部作特异性吸收。在脂肪体中成蛋白颗粒，在数天内在蛋白酶作用下水解。它的氨基酸组分与一般蛋白无多大差别，与前面讨论的几种六聚体贮存蛋白没有明显的关系。在半翅目的猎蝽、膜翅目的蜜蜂和木工蚁（*Camponotus festinatus*）中都有相似的 VHDL，但不存在色素，其发育轮廓也不很清楚。

### 4.4 富酪氨酸蛋白（tyrosine-rich protein）

富酪氨酸蛋白又称富酪蛋白（tyrostaurins），是一类含酪氨酸 27% 以上的蛋白质。由 Delobel（1992）发现于鞘翅目昆虫化蛹前短时间内，在脂肪体中合成和贮存，形成蛋白颗粒，稍后在昆虫发育过程中，即行分解，其中酪氨酸残基用于预成虫表皮的合成。富酪蛋白与其他贮存蛋白相比，不仅分子量较小，而且变化幅度较大 $(30\sim65)\times10^3$u，可溶性小，不向血淋巴释出。在鞘翅目中，有的种类只有芳香蛋白，而有的种类只有富酪蛋白，有的则两种都有。

从上述各类贮存蛋中可以看出，六聚体贮存蛋白中各类之间都存在相似性，可能因为它们都起源于血蓝蛋白，共同具有相对保守的亲水氨基酸，包括芳香族残基，在进化过程中这些结构仍未发生重大变化，氨基酸序列中普遍在多个位点上有苯丙氨酸和酪氨酸。鞘翅目昆虫中出现的富酪氨酸蛋白，可以看做蛋白质贮存策略的一种特化。

## 第三节 不同目昆虫体内的贮存蛋白

### 1 蜚蠊目

Kunkel 等在德国蜚蠊（*Blatlella germanca*）中鉴定到 1 种 16S 的贮存蛋白，属高芳香族氨基酸六聚体，产生于若虫和成虫期；另 1 种在 12 种蜚蠊体内均有发现，甚至与白蚁和螳螂之间具有免疫学交互反应。用分类学研究证实，它们之间有密切的相关性，

经纯化测定，含有大量芳香族氨基酸。两种蛋白最初出现于胚胎背部合拢期，以后随着蜕皮节律而周期性的出现峰值。在每次蜕皮前后瞬时峰值很低，前 1 种持续到整个成虫期，浓度与血淋巴中脂蛋白相似，因此称为持续性贮存蛋白（persistent storage protein PSP），但后 1 种在成虫期即告消失。Duhamel 等（1983）在东方蜚蠊中鉴定了富芳香氨基酸蛋白。

近年来 Wassmer 等（1996）在异翅木蠊（*P. pennsylvabica*）中分离到 1 种与发育相关的贮存蛋白（development associated storage protein DASP）分子量 $82\times10^3$u。在血淋巴中的浓度明显受光周期控制。一般血淋巴蛋白在长日照时（18:6）含量下降，而 DASP 在短日照时含量减少。

## 2　直翅目

在直翅目中唯一被研究过贮存蛋白的是飞蝗（*Lucsta migratoria*），已知道有 4 种贮存蛋白，分别是芳香蛋白 AP、LSP-1、LHP 和 PSP。据 Ancsin 等（1996）报道，有两种六聚体蛋白，与双翅目的 LSP-1 相似。芳香族氨基酸含量属中间水平、甲硫氨酸含量偏低或居中，分子量 $410\times10^3$u、16.1S，含 10%的己糖，由 5 个以上 $75\times10^3$u 亚单位组成，pI 为 6.0，在羽化后即告消失；另一种蛋白的甲硫氨酸含量很少，而芳香族氨基酸含量稍多。它的合成受 JH 的激发，并随 Vg 的发生而波动，一直延续到成虫期，因此属持续性贮存蛋白。分子量 $460\times10^3$u、16.4S，含 70%的己糖，主要亚单位的分子量为 $74\times10^3$u，次要的为 $77\times10^3$u。pI 为 5.6。两种贮存蛋白都带有某些微观不均一性。PSP 遇碱性可逆性地解离成单体，已经测到 $74\times10^3$u 亚单位的 N-末端序列。原先已得到鉴定的氰蓝蛋白（cyanoprotein）已得到纯化，分子量 $435\times10^3$u。亚单位的分子量 $69\times10^3$u。此外尚有一种贮存蛋白 LSP-Ⅱ已作出鉴定。飞蝗体内多种贮存蛋白不同程度地受 JH 的调控，反映了半变态昆虫的特点。

## 3　半翅目

在半翅目中，Gonzalez 等（1991）详细研究了猎蝽（*Tricotoma inferstans*）血淋巴蛋白，发现其中主要是高密度脂蛋白（HDLP）和极高密度脂蛋白（VHDL），两者既是载脂蛋白，又具有某些贮存蛋白功能。这些脂蛋白在雄虫的各个发育阶段有明显的变化。在若虫期，血淋巴中大量积累的是 VHDL，在最后一次蜕皮前达到峰值，VHDL 与 HDLP 在血淋巴中的浓度分别达 74mg/ml 与 42mg/ml；在蜕皮后前两周的成虫体内血淋巴中浓度急速下降，第 3 周后又再次增加，其中主要是 VHDL，因此认为它是半翅目昆虫的贮存蛋白。

Rehn 等（1990）在吸血蝽（*Rhodnius prolixus*）血淋巴中提纯并鉴定了 1 种非芳香基六聚体血淋巴贮存蛋白，称此蛋白为吸血蝽贮存蛋白（Rhodnius storage protein，SPR），该蛋白中含 0.69%的脂类和 1.04%的糖类，分子量 $470\times10^3$u，亚单位分子量 $78\times10^3$u，分子量小于丽蝇蛋白。若虫蜕皮变为成虫以后，仍以低浓度保持在血淋巴中，只在停食时才告消失。

Faria 等（1994）纯化了吸血蝽雄成虫的血淋巴蛋白 SP2，天然分子量 $445\times10^3$u，亚

单位分子量 $76\times10^3$u，在成虫饥饿时往往被消耗殆尽。利用 western 印迹分析表明，当 SP2 在血淋巴中减少时，脂肪体内的含量增加，但它的合成已告结束。有趣的是，成虫精巢也有合成 SP2 的功能。

Rimoldi 等（1989）在猎蝽（*Triatoma infestans*）中纯化了 1 种高密度脂蛋白。Sula 等（1995）在无膜翅红蝽中发现 1 种六聚体贮存蛋白，它是一种与滞育相关的血淋巴蛋白。

## 4 鳞翅目

在鳞翅目昆虫中，一般都含 1～2 种贮存蛋白，有的种类多到 3～4 种。在惜古比天蚕蛾中，Telfer 等分离到芳香蛋白和富甲硫氨酸蛋白，另 1 种是核黄素结合蛋白。Tojo 等从提取物中获得 2 种抗原和电泳谱带非常清晰的富甲硫氨酸六聚蛋白，它们之间可能存在相近的进化关系。在蛹的血淋巴中分离到 1 种与黄素蛋白结合的六聚体，其性质不同于芳香蛋白和富甲硫氨酸蛋白，尚未测定它是否和别的鳞翅目昆虫贮存蛋白有同源性。

在粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）中，Kunkel 等（1990）发现末龄幼虫的 1 种贮存蛋白与烟草天蛾和舞毒蛾的同源，另 1 种含量较少，与天蛾贮存蛋白同源。已鉴定出贮存六聚体包括芳香蛋白和富甲硫氨酸蛋白。另外还存在 JH 抑制六聚体，并已获得 cDNA 克隆，推断出氨基酸组分，其中含 9.3% 芳香族氨基酸和 1.8% 的甲硫氨酸。Thompson 等（1996）发现 JH 抑制蛋白与烟芽夜蛾（*Heliothis virescens*）的氨基酸组分有 78% 是相同的。

烟草天蛾（*Manduca sexta*）中分离到 2 种贮存蛋白。Kramer 等（1980）对其中之一芳香蛋白进行分离提纯和定性。Willot 等（1989）对芳香蛋白进行了提纯克隆与测序。Ryan 等（1985）在研究雌性特异蛋白同时，测定了有关的富甲硫氨酸蛋白。Corpuz 等（1991）研究指出，贮存蛋白在末龄幼虫期积贮，在化蛹与羽化前后被利用。克隆了 2 种 cDNA 贮存蛋白 SP1A 和 SP1B 两者与家蚕雌性特异性贮存蛋白（SP1）相比，前者有 37% 的氨基酸序列是相同的，后者有 63% 是相同的，两种贮存蛋白只在 5 龄时在脂肪体内合成，分别有 2 种基因在特定的组织与时期进行表达，在体内注射 20-羟基蜕皮酮后合成贮存蛋白的 mRNA 被激活，而被保幼激素类似物所抑制，由此证实了富甲硫氨酸的激素调控机制。

在大芭蕉弄蝶（*Caplodes ethlius*）中，Palli 等（1987）发现了 4 种六聚体贮存蛋白，1 种是芳香蛋白，2 种属富甲硫氨酸蛋白，但另 1 种既不是芳香蛋白也不是富甲硫氨酸蛋白。

家蚕贮存蛋白的资料在鳞翅目昆虫中最为丰富。Tojo 等已经从贮存蛋白中分离到 1 种芳香蛋白和 1 种富甲硫氨酸蛋白。Fujii 等（1989）对芳香蛋白进行提纯与测定。Fujiwara（1992）对 Bm LSP 进行了克隆和测序，通过 Southern 杂交印迹分析，证明是一个单拷贝基因。

在月虹大蛾（*Tropacea luna*）中，Pan 等（1996）指出其贮存蛋白包括芳香蛋白和富甲硫氨酸六聚蛋白。后者在雌虫体内含量很大，表明它是卵黄蛋白合成所需的氨基酸库，芳香蛋白则成为成虫发育所必需。然而另有研究者认为真正的靶标还不十分明确。

此外，对谷实夜蛾、灰翅夜蛾、甘蓝夜蛾和大蜡螟的贮存蛋白都已经有很多研究，使鳞翅目贮存蛋白和双翅目的一样，成为阐明贮存蛋白合成和利用机制的主要试验对象。

## 5 鞘翅目

在鞘翅目中，黄粉甲（*Tenelrrio molitor*）与马铃薯甲虫（*Leptinotarsa decemlineata*）的类芳香蛋白曾由 Delobel 等（1992）和 Ockorzt 等（1994）进行了较多研究。后者贮存蛋白已测序，虽含有较多的芳香族氨基酸，但结构相似性较低。Silhacek 等（1994）指出，1 种与黄素蛋白结合的贮存蛋白亚单位为 $85\times10^3$u，2 个亚单位构成的二聚体蛋白的分子量为 $170\times10^3$u，并用 Western 印迹法得到证实。其中约含 6.5%的糖类和 1.9%的氨基酸，含有较高的组氨酸和非特征性组分精氨酸，纯化时与核黄素结合的链遭破坏。

Koopmanschap 等（1992，1995）研究发现，马铃薯甲虫芳香蛋白是由滞育蛋白基因编码的，并详细分析了它的基因构成和氨基酸系列。它发生于末龄幼虫期或处于短日照条件下的成虫期，是 1 种六聚体结构，亚单位分子量为 $82\times10^3$u，它受保幼激素类似物 Pyriproxyfen 的抑制，相反，另 1 种特异性蛋白则受到它的激发。

## 6 双翅目

双翅目昆虫贮存蛋白早在 1967 就由 Munn 从红头丽蝇中分离到丽蝇蛋白，以后 Kinnear 等从澳大利亚丽蝇中分离到 LSP2。前者属芳香蛋白，后者所含的芳基氨基酸含量较低而列入另一类。后来发现，在澳大利亚丽蝇、地中海实蝇、黄猩猩果蝇、铜绿蝇（*Lucilia cuprina*）和家蝇中均有丽蝇蛋白。除丽蝇外，在多种果蝇中分离到 LSP2。Roberts 和 Brock 在分离提纯和测序的基础上，系统地研究了两种六聚蛋白的进化关系。

Telfor 和 Kunkel（1991）区分了高等双翅目昆虫芳香蛋白的类型。一类是丽蝇蛋白，这是红头丽蝇的主要六聚蛋白和果蝇的主要芳香蛋白幼虫血清蛋白Ⅰ（LSP1），它们共同的特点是苯丙氨酸和酪氨酸含量>20%，并有>4%甲硫氨酸；另一类是果蝇幼虫血清蛋白Ⅱ（LSP2），仅含适量的芳香氨基酸（15%的苯丙氨酸和酪氨酸）以及中等含量的甲硫氨酸（2.8%）。丽蝇蛋白与 LSP1 属异质六聚体，由多重相关的多肽链结合而成；而 LSP2 是 1 种同质六聚体（Levenbook，1985；Wolfe 等，1972，Akam 等，1978，Brok 和 Roberts 1980）。但 LSP1 和 LSP2 在幼虫发育时表现的特征很相似。分离到 2 种基因分别为 Lsp1b 和 Lsp2，在地中海实蝇（*Ceratitis capitata*）中的情况也是如此（Chrysathis 等，1994）。但在低等双翅目昆虫美洲摇蚊（*Rhyachosciora americana*）中 de Bianchi 和 Marinotti（1984）发现只存在 1 种类芳香蛋白。

Konig 等（1980）用丽蝇蛋白抗血清区分出果蝇 4 种 LSPⅡ亚单位。研究两个蚊亚科 6 个种 4 龄幼虫的血淋巴中的贮存蛋白，其中包括埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）、白纹伊蚊（*Aedes albopictas*）、库蚊（*Culex restuans*）、冈比亚按蚊（*Anopheles gambiae*）、四斑按蚊（*A.quadrimaculatus*）和淡色按蚊（*A.albimanus*）。每个种至少有 2 种多肽，分子量（66～85）$\times10^3$u，与果蝇六聚蛋白或 LSP 亚单位有相同的迁移率。6 种蚊子的六聚蛋白之间有很多相似之处。

用黄猩猩果蝇与红头丽蝇的六聚蛋白多克隆抗体测定蚊子 4 龄幼虫血淋巴中丰富的多肽和与高等双翅目昆虫芳香蛋白的相关性。结果表明丽蝇蛋白抗血清可区分果蝇 4 种 LSP 亚单位，有 3 条不同迁移率的电泳谱带。由果蝇的 LSP1 与 LSP2 的特异性血清，鉴定出

蚊子中迁移率最低的谱带为 LSP2 亚单位，中等移迁率相当于 LSP1δ 亚单位，最大迁移率中 LSP1β 和 1α 两种亚单位共同的结果。由此认为，蚊子幼虫的六聚蛋白可能是 1 种混合的异体六聚物，而不同于高等双翅目昆虫的两种全蛋白。

### 7 膜翅目

六聚蛋白也发生在膜翅目中。Ryan 等（1985）认为，意大利蜂（*Apismellifera*）有 1 种芳香蛋白，但酪氨酸与苯丙酸的量远低于双翅目的丽蝇蛋白。

## 第四节 贮存蛋白的组织和细胞定位

运用超滤离心（Munn 等，1969）、PAGE（Kinner 等，1975）、SDS-PAGE 凝胶电泳（Sekeris，1977）、免疫扩散（Tojo 等，1978，1980）和火箭免疫电泳（Laurell，1972）等技术测得贮存蛋白的合成部位在昆虫的脂肪体内，特别是前端围脏脂体内，并用 Lowry 法等一系列方法明确了贮存蛋白在脂肪体和血淋巴中的含量变化。

Munn 等（1969）指出，在丽蝇脂肪体内大约有 11 500 个细胞，在幼虫期它们的体积增大非常明显，但细胞并不分裂，因而数量不变。贮存蛋白的合成是从 2 龄后半期开始的，随着幼虫的生长与发育，合成进入高峰期。Ruth（1983）以红头丽蝇为例，用免疫荧光技术和组织化学方法结合光镜与电镜观察，综述了贮存蛋白合成期脂肪体及其细胞学变化。

### 1 组织和细胞定位

在光镜下观察表明，丽蝇末龄幼虫第 4 天细胞已增至 30～50μm，细胞中除核以外，出现脂肪颗粒与囊泡。5d 后随着幼虫体积和重量增至最大值，脂肪细胞直径超过 200μm，脂肪颗粒与囊泡也随之增多。7d 后出现 2 种贮藏颗粒，大的呈异型体，小的呈暗色体。刚化蛹的白蛹中，出现大量暗色贮存体及脂滴。在电镜下可以清晰看到蛋白颗粒的变化，包括与合成、转移和贮存有关的细胞器的分化。末龄幼虫 3d，细胞内出现游离核蛋白体、大型线粒体及大量粗面内质网（RER），并有胀大的细胞池，表明贮存蛋白的合成已开始。至第 4 天，RER 增加到最大值，同时线粒体伸长，有大量的嵴，当蜕皮激素呈现第一个小峰时，进一步可看到糖原颗粒，至第 5d RER 面积增加，蛋白质合成减退，向血淋巴释放丽蝇蛋白，当时胞膜内褶增加，细胞表面积扩大。至第 7 天脂肪体又从血淋巴摄取蛋白质，出现大小不同的脂滴，可见两种贮存蛋白体，大的为异型体，小的为电子致密颗粒。前者含细胞器，如线粒体、RER 和糖原，它们被再建成大型囊泡，囊泡最终成为高电子致密颗粒。当时蜕皮激素呈现第二个小峰，以后出现大峰，脂肪体从血淋巴中吸收的蛋白量增多，形成具晶体的蛋白颗粒。其中并含有酸性磷酸酯酶，电子致密的小颗粒充满整个贮藏体中，第 8 天刚化蛹不久（白蛹），脂肪细胞中除脂滴和糖原以外，看到电子致密的贮存颗粒，线粒体大小不一。随着蛹的发育，贮存颗粒进一步增加，这时新表皮已经形成，脂肪细胞的内含物逐渐消失，但 RER、核蛋白体、线粒体和贮存体仍然存在、核膜完整、内外层均可认辨。

据陈长琨和王荫长等对小地老虎脂肪体内异型蛋白颗粒的电镜观察，从预蛹期开始，由于组分的来源不同，存在4种不同形式的蛋白颗粒：①由多个衰退的线粒体合并形成的颗粒，外形多呈椭圆形，内具细而密的残嵴，电子致密程度较高，形成的蛋白颗粒中仍可见到残余的线粒体外形，囊胞无被膜；②由内质网集聚形成的颗粒，先由正常的内质网聚集小团，然后局部膨大成囊状，电子密度增高，颗粒外围也不存在被膜；③由游离膜包围糖原和蛋白微粒形成糖蛋白颗粒，开始时由游离膜分别包围糖原和蛋白微粒，然后两者合并，有被膜，周缘吸附蛋白微粒；④由游离膜包围线粒体，粗面内质网和糖原形成颗粒；因此也有被膜。由此可见脂肪体中贮存蛋白的细微结构不同于卵黄蛋白，首先是由其来源决定的，其次，在积聚和加工过程中同一颗粒还有许多不同的形态变化。

综上所述脂肪体大量合成贮存蛋白，虽然一部分由末龄幼虫取食时所积累，但更多的来源于幼虫期细胞器的消化与重新利用，脂肪细胞成为蛋白质加工厂。

## 2 含量变化

昆虫体内血淋巴蛋白的含量能在短期内急剧增加，曾经令人十分惊讶。以红头丽蝇为例，从开始时15mg，到3龄时增至120mg，其中LSP1为7mg，LSP2为8mg，到停止取食时，LSP1的含量占总可溶性蛋白含量的50%以上，化蛹期有所下降，稳定在高峰时的75%左右。澳大利亚丽蝇脂肪细胞合成LSP的最大速度为每天每细胞0.4mg，其中80%为LSP1，充分发育的幼虫每天可产生脂肪体3.7mg左右，漫游期开始血淋巴中浓度降低到正常量的20%，LSP1合成停止，但LSP2的合成可持续若干天。Sekeris和Scheller（1977）测定红头丽蝇中蛋白质的合成速率，用$^{32}$S-甲硫氨酸掺入可溶性蛋白的速率表明，合成曲线呈“U”字型，末龄4天的掺入率最高，成虫发育期处于最低，羽化前又有一个短暂的增加。类似结果在黑丽蝇变态期也是如此。从放射活性看，末龄3～4d幼虫LSP-1合成加快，4～5天时合成停止，恢复到一般水平，mRNA也呈缓慢下降趋势，至第8天降到可检测水平，直到蛹和成虫期均如此。

陈长琨和王荫长（1995）研究棉铃虫和小地老虎脂肪体内蛋白颗粒的形成和消失的结果表明，在幼虫末期，脂肪体扩大成宽带状，细胞体积增大，同时出现双核或多核，进入预蛹期，细胞内开始出现蛋白颗粒，蛹龄1d，脂肪体转变成块状，细胞内充满大型蛋白质颗粒，在5～10d时，幼虫脂肪体崩散，至12天形成预成虫，脂肪体细胞重新出现，仍充满蛋白颗粒；同时幼虫期发达的粗面内质网和线粒体，也转变为蛋白颗粒。从脂肪体内蛋白含量的变化来看，6龄幼虫期每克脂肪体含蛋白质7.1～8.4mg，至预蛹期达到16.3mg，蛹龄2～8d又急剧下降，到蛹龄9～13d，再度上升。这种变化在雌蛹中尤为明显。蛹期脂肪体内充满着几种蛋白的颗粒，在羽化为成虫后，24h内颗粒全部消失。棉铃虫在变态过程中的变化动态与小地老虎完全一致。苹果天幕毛虫（*Malacasoma americana*）、大菜粉蝶（*Pieris brassicae*）和红头丽蝇（*C.erythrocephata*）都有这方面的研究记录。最详细的是从惜古比天蚕蛾（*H.cecropia*）、家蚕（*Bombyx mori*）和大芭蕉弄蝶（*C.ethlius*）的研究中得到的。当血淋巴中蛋白质含量下降时，脂肪体内蛋白含量明显上升。反映了脂肪体对贮存蛋白的内吞效应，并发现当标记蛋白注射进入幼虫血淋巴以后，脂肪体内出现放射活性，并且存在特异性选择摄取机制。当黄猩猩果蝇末龄幼虫体内注入

$^{14}C$-亮氨酸和$^{3}H$-幼虫血淋巴蛋白后，结果在蛹期脂肪体中，只有$^{3}H$标记的蛋白颗粒，说明脂肪体的合成能力和六聚体基因的转录作用。另有一些研究结果表明，这种转录在幼虫停止取食时结束。只有少许鳞翅目昆虫，到预蛹期细胞内吞时，六聚蛋白的合成还持续在低水平状态。

## 第五节 贮存蛋白的功能

昆虫贮存蛋白的功能，可以归纳为三个方面：首先为成虫发育和完成变态提供蛋白，用于体内组织的形成和生殖的需要；其次是贮存蛋白的亚单位和一些片段直接进入结构蛋白中，诸如掺入到围蛹、成虫表皮和飞行肌中；其三是作为亲脂物质的载体，参与脂类运输。

### 1 蛋白质和氨基酸的贮存库

Munn 和 Greville（1969）首先发现贮存蛋白在蛹期以蛋白质晶体贮存在脂肪细胞内，通过降解得到氨基酸，满足成虫生长发育和生殖的需要。用$^{14}C$标记研究发现，在变态期间，幼虫的贮存蛋白水解成游离氨基酸，重新参与成虫蛋白质的合成。测定红头丽蝇成虫头、胸和腹部的蛋白质放射活性表明，芳香蛋白中芳基氨基酸和许多其他氨基酸都参与成虫多种蛋白质的合成，在时间上可以分为蛹和成虫两个时期，对于成虫主要在发育早期利用。

Levenbook 和 Bauer（1984）还用$^{14}C$-苯丙氨酸的代谢试验，测得在羽化 48h 和 96h 后红头丽蝇成虫的提取物中 LSP-1 滴度明显下降。48h，腹部可检测到 LSP-1，这可能来自脂肪体，至 96h 已观察不到，而胸部蛋白质的放射活性增加，还出现分子量分别为 $210\times10^{3}u$ 和 $420\times10^{3}u$ 的两个特殊蛋白，它们可能成为肌球蛋白和肌动蛋白。在 4 日龄的成虫中，标记物在飞行肌中最多，其次便是表皮。在足肌和翅中都会有较高的放射活性，反映了这些组织中存在 LSP-1。Levenbook 和 Bauer 曾提出了这样一些问题：在成虫发育前昆虫蛋白还是静止的，进入发育后却突然解降，其机制是什么？哪种蛋白酶参与了反应？如果贮存蛋白是氨基酸的一个简单贮存场所，那么胱氨酸来自何处？因为 LSP-1 缺乏这种组分。为了研究贮存六聚蛋白在变态期的功能，将$^{14}C$-丙苯氨基酸标记的丽蝇蛋白注射到红头丽蝇的幼虫体内，在幼虫发育的第 5 天到成虫中期，注射物仍保持有丽蝇蛋白的 SDS-PAGE 迁移率，只有少量排出体外。在 4 日龄成虫中，丽蝇蛋白消失了，标记物广泛分布到各种组织中，46.5%进入胸肌，10.8%成为表皮的 SDS 不溶性组分，少量分散到其他组织内。SDS-PAGE 凝胶电泳放射自显影说明，大量蛋白质被重新标记，包括特异的肌动蛋白和肌球蛋白。丽蝇蛋白作为苯丙氨酸的来源，同时也掺入了其他氨基酸，一起参与了新组织的形成。在 7 日龄幼虫中，注射后头几个小时丽蝇蛋白进入表皮，使幼虫、蛹和成虫的表皮颜色变深。

据 Duhamel 和 Kunkel（1987）报道，东方蜚蠊末龄幼虫蜕皮时有一个选择性摄取过程。将大量外源性蛋白注射到蜚蠊或惜古比天蚕蛾蛹内，在成虫发育时即从血淋巴中消失了，而且分子量越小，消失得越快，$45\times10^{3}u$ 的小牛血清蛋白和 $58\times10^{3}u$ 的人血清蛋白

在雄虫体内的消失速度即快于 $510\times10^{3}$u 的卵黄蛋白。从中说明，雄虫体内对蛋白质的利用具有非选择机制。另一方面脂肪体却选择性地摄取芳香蛋白和血淋巴黄素蛋白。它们由于进入脂肪体，在血淋巴中很快就被清除了，特别是在末龄幼虫蜕皮时，这种现象表现得很明显。在鳞翅目成虫发育时，血淋巴中蛋白质的选择性或非选择性清除发生在 1 个或几个位点上。在蜚蠊雌成虫中，由于糖基化部分的氧化，会使卵母细胞对卵黄蛋白丧失亲和性，它们被脂肪体或围心细胞所清除。在澳大利亚丽蝇中，外来蛋白也是由围心细胞清除的。

随着脂肪体细胞摄入能力的恢复，溶酶体活性增加，使蛋白质的消化水平超过积贮水平，到预成虫期血淋巴中的贮存蛋白就这样被选择性地清除干净。红头丽蝇在化蛹时，脂肪体内酸性磷酸酯酶的活性达到峰值，溶酶体自体吞噬后贮存蛋白颗粒和细胞质被消化，结果使脂肪体消失。鳞翅目预成虫体内的脂肪体在两性之间存在差别：在雄虫体内脂肪体细胞在变态时依然存在，但贮存蛋白颗粒消失了；而雌虫体内进入蛹期随着卵的形成，脂肪体明显衰退，至成虫期只保留少数具有蛋白颗粒的脂肪细胞。

## 2 参与新表皮的形成

Scheller 等（1980）首次发现丽蝇蛋白参与昆虫表皮的形成。后来陆续发现丽蝇、家蝇、烟草天蛾和蜡螟等新表皮中都有芳香蛋白的掺入，包括前肠围食膜、气管和唾腺内膜中的表皮层。用 $^{125}$I 标记的红头丽蝇的芳香蛋白注入到果蝇幼虫中，化蛹时测定不同器官中的标记物，发现体壁的放射活性不断增加，而血淋巴中渐次下降，脂肪体和马氏管中放射活性极低。由于芳香蛋白被修饰而掺入到新表皮中，结果放射性标记物先进入内表皮而不是外表皮，每次蜕皮后新表皮形成时都是如此，外表皮中标记物可能被修饰或鞣化而丧失，也可能就没有进入。

Levenbook 和 Bauer（1984）曾将 $^{14}$C-丙苯氨酸标记的丽蝇蛋白注射到末龄红头丽蝇体内，在 7 日龄幼虫中头，几个小时即发现丽蝇蛋白进入表皮，其抗体能使幼虫、蛹和成虫的表皮着色，用 SDS 抽提物的免疫探针，即能测到幼虫和蛹的表皮中完整的丽蝇蛋白，说明它们未经降解而直接进入表皮。用注射过的供试昆虫与分离到的体壁一起，在施奈德培养基中温育以后，可以出现表皮的骨化作用，说明血淋巴中分离的丽蝇蛋白能在离体条件下与二元醌交联。

在美洲蜚蠊和烟草天蛾中，表皮蛋白与血淋巴蛋白存在抗原相似性。在飞蝗中，抗原是 1 种贮存的六聚体蛋白；在烟草天蛾中，用 SDS-PAGE 凝胶电泳的免疫探针检测到 5 龄幼虫与蛹表皮的芳香蛋白型六聚物。这种表皮蛋白是否来自血淋巴的芳香蛋白或者是由皮细胞合成的，曾经受到怀疑。当时在皮细胞中检测到了芳香蛋白的 mRNA，所以烟草天蛾的芳香蛋白从脂肪体通过血淋巴供给以外，确认了皮细胞的自身合成能力，并且观察到皮细胞顶端的分泌物。但是，在红头丽蝇中脂肪体却是唯一具有合成芳香蛋白 mRNA 的位点，从标记蛋白结合作用表明，血淋巴参与芳香蛋白的运输。

## 3 贮存蛋白与卵的发育

贮存蛋白对卵的形成具有重要作用。果蝇幼虫发育期，缺乏六聚蛋白会明显减少成蝇

的生殖能力。鳞翅目昆虫的富甲硫蛋白在雌虫体内的含量远远超过雄虫，成为卵形成时的蛋白质或氨基酸库。在舞毒蛾中缺乏富甲硫氨酸蛋白，雌虫体内芳香蛋白的量超过雄虫7倍以上，由此弥补了富甲硫氨酸的不足。成虫期的贮存蛋白，大多来自幼虫期摄取的营养，为以后卵的形成准备了必需的氨基酸，这是鳞翅目昆虫蛋白质利用的一种模式，因此雌雄之间具有明显的差别。Ogawa 与 Tojo 等（1981）认为家蚕雌蛾贮存蛋白中很多甲硫氨酸是用来建造卵壳的，并可转化为其他氨基酸，以满足卵发育时的需要，而贮存蛋白中缺乏的胱氨酸，可能有别的供应渠道。

### 4 贮存蛋白的载体功能

某些贮存蛋白与形态发生并无明确的关系。在这类蛋白中常存在低水平的脂类，它们对某些基质相对地具有非选择性亲和力。这种性质可以解释贮存蛋白在血淋巴中有清除激素的作用机制。惜古比天蚕蛾的黄素结合蛋白中的核黄素提供了一个配体结合的例子。Framer 用光亲标记和荧光淬灭技术证明丽蝇幼虫的芳香蛋白可与血淋巴中90%的蜕皮甾醇结合，至蛹期，芳香蛋白中丝氨酸残基磷酸化时，再将结合的蜕皮甾醇释放出来。Haunerland 和 Bowers（1986）发现，谷实夜蛾的芳香蛋白和 VHDL 还能结合血淋巴中的疏水性杀虫剂，说明贮存蛋白在亲脂性物质的运输中，也起重要作用。

## 第六节 贮存蛋白的基因表达调控

Thomson 等（1976）研究了丝光绿蝇（*Lucilia cuprina*）贮存蛋白的遗传性。用针刺绿蝇幼虫体壁，收集血淋巴并加以稀释，然后在碱性条件下进行 PAGE 分析，观察 LSP 的谱带，比较绿蝇野生种和驯化种的 LSP-1 的遗传性，发现野生种的 LHP-1 亚单位呈现高度的多态性，180 个幼虫有 90 个不同的亚单位表现型。如果澳洲绿蝇和寄主羊是在200年前来到当时栖息地的话，竟然能在如此短期内发生这么多的变化，出现如此高度的多态性，这是令人不可思议。然而尽管有各种不同的表现型，但它们从幼虫到蛹期都比较稳定，这就表明贮存蛋白的亚单位存在一种共同的控制机制。亚单位合成以后，一旦进入血淋巴，直到为成虫所利用，就不再进行修饰。在惜古比天蚕蛾中，也证实在此之前有一个对 LHP-1 进行控制和协调的机制。

### 1 基因定位

利用近交系统，通过贮存蛋白 LSP 的谱带位置和强度，以及亚单位的变化情况，发现了12个接近的相关基因的结构位点，并通过基因复制，进行了人工定位，证实这些位点存在2个或更多的共显等位性变异，所有 LHP 特异性顺反子都定位在第二条染色体上。

用红头丽蝇脂肪体上 LSP-1 的 mRNA 做模板，在逆转录酶催化下合成 cDNA，然后用$^3$H 标记，与幼虫唾腺的多线染色体进行原位杂交，再用照相胶片包埋，进行银染定位和放射自显影，结果发现银染仅出现在单线染色体的末端，说明它的基因是在单线染色体上。

cDNA 与总 DNA 的杂交显示，只有1个或2个编码 LSP-1 的 mRNA 单倍体基因组序

列。这种在各个 LSP-1 亚单位间的差异，假如不是转录后修饰的结果，则单个或 2 个 LSP-1基因是真正集中在单位点上的多肽基因。Schenkel 等（1985）证明，编码红头丽蝇和果蝇的两种 LSP-1 顺反子在遗传上有某些相似性。

Roberts（1987）对果蝇的 LSP 进行了广泛的遗传学和分子生物学的研究，搞清了 LSP 中 LSP-Ⅰ的 α、β、γ 三个亚单位和 LSP-Ⅱ的基因定位情况（表 4-4）。从中可以知道黄猩猩果蝇的 LSP 基因分散在 3 条染色体上，和丽蝇 LSP 基因集中在单一的染色体上有显著的差别。

**表 4-4 黄猩猩果蝇 LSP-Ⅰ和Ⅱ基因的定位**

| 克隆基因 | 染色体 | 区 域 |
|---|---|---|
| LSP-Ⅰ，α | X | 11A7-11B9 |
| | X | 11A7-9 |
| LSP-Ⅰ，β | 2L | 21D2-22A1 |
| | 2L | 21D3-5 |
| | 2L | 21D、E |
| LSP-Ⅰ，γ | 3L | 61A1-61A6 |
| | 3L | 端粒（telomere） |
| | 3L | 端粒（telomere） |
| LSP-Ⅱ | 3L | 68E2-68E4 |
| | 3L | 86EF |

果蝇 LSP-Ⅰ的 α 基因定位在 X 染色体上。雌虫有两条 X 染色体，雄虫仅有 1 条 X 染色体（XY）。Roberts 和 Brock（1981）就此回答了 LSP-Ⅰα 基因的性别差异与其亚单位数有关的问题。在雄性或雌性杂合体幼虫中，α、β 与 γ 亚单位的比例，因缺少 1 个 α 基因，它出现的机率仅 1/2，其表达就不存在剂量补偿作用。对于纯合体，该基因只是 X 染色体的一部分，缺乏大多数 X 连锁基因中所具有的剂量补偿的调节功能。

分析克隆的 α、β 和 γ 基因杂种双链核酸分子及它们的熔点温度，发现它们之间存在进化关系。α 和 β 基因同源的碱基序列达 $2.5\times10^3$，β 和 α 间达到 $2\times10^3$，而 α 和 γ 是 $1.7\times10^2$，由此可见，它们之间的进化关系是先出现 β 的 α 基因，然后由 β 基因再生产出 α 基因。在这种进化过程中，3 个基因以同等数目的拷贝分散在 3 条染色体上。15 种果蝇的研究结果，支持了这种看法，即所有果蝇都具有 LSPⅡ和 LSP-Ⅰ的 β 类亚单位，并发现只有黄猩猩果蝇的姊妹种有 LSP 的 α 类序列。这些结果都表明 LSP-Ⅰ的 α 和 β 基因的分离，远远晚于 LSP-Ⅱ同 β 和 γ 基因的分离。

黄猩猩果蝇的第二种六聚体贮存蛋白 LSP-Ⅱ在基因组中是单拷贝表达的，而复制和多基因族不能完全反映六聚蛋白的普遍特性。

Doliffte（1981）认为基因的同源复制与随后的分化，成为现代蛋白的多样性起源。在后来形成的六聚蛋白中，不仅可以看到它们的氨基酸序列的相似性，而且也表现在内含子与外显子的结构上。家蚕和烟草天蛾的芳香蛋白基因以及家蚕的富甲硫氨酸六聚体基因，都有 5 个大小一致的外显子和内含子结构，保守性较小，说明在广泛的序列和长期的分离协调中起重要作用。

家蚕富甲硫氨酸六聚蛋白第 5 外显子比芳香蛋白基因的要多 80 个碱基，这种 DNA 在末端肽中附加氨基酸的方式，成为变异的主要来源，外延部分特别富于甲硫氨酸（27%），

因而更适合于这类六聚蛋白的独特组合。

Willott 等（1989）曾经利用序列和可以构建系统树的遗传距离母体，比较了一些昆虫六聚蛋白与节肢动物血蓝蛋白基因的结构区。提出了六聚蛋白和节肢动物进化的观点。烟草天蛾芳香蛋白大约在较早分化为两个亚单位，在此基础上推算非同义密码子（nonsynona mous）的进化速率。以家蚕和烟草天蛾芳香蛋白的亚单位进行比较，发现更早发生种的分化，正好在烟草天蛾家系中 α-β 化分之前。家蚕中芳香蛋白和富甲硫氨酸蛋白的分化，基于非同义密码子碱基相同的置换速率。根据计算，进化时间远于前面两种，这也有助于推断昆虫纲的起源。

昆虫六聚蛋白测序结果表明，与节肢动物血蓝蛋白氨基酸约有 22% ~28% 相同，芳香蛋白与高甲硫氨酸蛋白之间相似性小于 30%～33%，粉纹夜蛾独特的贮存六聚体与烟草天蛾芳香蛋白有 25%相同，富甲硫氨酸蛋白与家蚕有 26%是相同的，与血蓝蛋白的氨基酸序列相同 22%。这许多序列保存在一定的定位区域，这些区域在血蓝蛋白亚单位之间形成一些接触，邻近 α-片段的起点与终端。在 3 种已测序的贮存六聚体中，6 种铜结合的组氨酸中只保存了 1 个。

血蓝蛋白与非呼吸血清蛋白之间有相似的大小与组分，它们之间的分化可能发生于非常久远的年代，与节肢动物最小的年龄一致。从某些甲壳纲和蛛形纲中的非呼吸血清蛋白相比，昆虫的六聚体蛋白与血蓝蛋白的关系更为直接。

## 2 基因序列和表达

用 cDNA 克隆编码的 AaHex1 和 AaHex2 来说明六聚蛋白 mRNA 的表达。在伊蚊和按蚊中，只在 4 龄幼虫期表达并出现峰值，但化蛹后立即消失。另一些双翅目昆虫中，六聚蛋白 mRNA 在幼虫末龄期之前表达，在较早的幼虫期缺少 mRNA。由此认为蚊子的六聚蛋白不像鳞翅目的芳香蛋白在蜕皮时被利用（Webb & Riddiford，1988），它的六聚蛋白 mRNA 在蛹的早期消失。丽蝇蛋白和 LSP1 的 mRNA 也不同于 LSP-2 的 mRNA。因为后者在蛹期仍稳定地保持较高水平（Powell 等 1984，Lepesant 等 1986）。在地中海实蝇中 LSP-1 丽蝇蛋白和另 1 种类 LSP-1 蛋白的合成在化蛹期停止，被脂肪体摄取。相反，LSP-2 与 1 种地中海实蝇贮存蛋白 MLSP4 在蛹期仍继续积累，甚至到成虫期。这可能与激素调控有关。

Benes 等（1991）报道，伊蚊和按蚊发育到预成虫时，六聚蛋白基因转录本进入稳定状态时，以杂交的修饰作用使用异源探针进行 Northern 印迹分析。Korochkina 等（1997）利用果蝇核糖体蛋白基因 mRNA（即 P49），以调控杂交筛选物的 RNA 水平。以此作为杂交信号，在严格条件下（0.1X SSC，0.1%SDS，55℃）冲洗没有明显地减少信号。该基因十分成功地保存在果蝇、伊蚊和按蚊中。埃及伊蚊 1～6 日龄幼虫和初期（蛹）或晚期蛹经与总 RNA 杂交，作为 4 种双翅目六聚蛋白基因探针。在培养条件下，1～2d 相当于 1 龄幼虫（L1），3d、4d 和 5d 分别相当于 L2，L3 和 L4。比较不同的匀质和异质探针的效果，发现所有筛选物均被杂交。在不太严格的条件下（37℃，50%甲酰胺）即 37℃，2XSSC，0.1%SDS 冲洗，在 5/6d（L4）时与 AaHex1 和 AaHex2 cDNA 探针杂交，得到了很丰富的转录本，大小约 1.8kb，说明在 L3 时，已开始有 AaHex2 mRNA 的少量积累，

令人注意的是在化蛹时转录本很快就消失了。1.8kb 的转录本编码蛋白小于原先估计的 84 和 $24\times10^3$u。这可能在伊蚊六聚蛋白后期翻译时进行了修饰，只保留了 1 个N-键糖基化点。与 LSP-1 抗血清有交互反应的 AaHex3 蛋白虽然比较丰富，LSP-1β 探针只显示出 1 个 1.8kb 的转录本，说明用 LSP-1β 探针还缺少有效的杂交。这可能不只是伊蚊 LSP-1 同质抗体对编码氨基酸的识别问题，而且是果蝇与伊蚊之间编码的差别（Besasky，1993)。

用 AaHex1、AaHex2、LSP-1β 和 LSP-2 4 种六聚蛋白基因探针与冈比亚按蚊幼虫和蛹的总 RNA 杂交，结果显示 1 个相似的六聚蛋白 mRNA（2.2～2.3kb）的幼虫表达框架。根据果蝇与按蚊之间编码的相似性（Besansky，1993），果蝇杂交的 LSP-1β 探针对按蚊转录本的有效性超过对伊蚊的。另外，还有一个很弱的 3.9kb 带，甚至在更强烈的冲洗之后（0.5 XSSC，42℃）仍能用 LSP1β 探针测定。LSP-2 探针与其他 3 种探针有相似的动力学，可以看到测定 mRNA（22.2kb）用异质的果蝇探针测定，对按蚊相对有效，说明按蚊六聚蛋白基因转入果蝇 LSP 突变体。

Haunerland（1996）比较了 14 种六聚蛋白的氨基酸序列，从中可以看出它们之间的同源性。将有关数据统计分析结果列于表 4-5。这些氨基酸序列大都是从基因核苷酸序列推导得到的。

**表 4-5 14 种六聚蛋白序列相似性比较**

（仿 Haunerland，1996）

| | Man-A | Bom-A | Gal-A | Man-M | Tri-J1 | Bom-M | Tri-J2 | Tri-aJ | Gal-82 | Lep-A | Bla-A | Cal-A | Pro-2 | Hemo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Man-A | | 90.0 | 85.5 | 68.8 | 68.3 | 68.3 | 69.7 | 69.5 | 69.4 | 66.6 | 64.8 | 64.4 | 65.9 | 63.5 |
| Bom-A | 66.6 | — | 83.3 | 68.5 | 66.7 | 67.7 | 69.5 | 68.0 | 67.1 | 67.2 | 63.2 | 65.4 | 65.6 | 61.8 |
| Gal-A | 54.2 | 49.9 | — | 69.7 | 67.1 | 67.1 | 70.0 | 66.6 | 69.2 | 68.0 | 63.0 | 63.8 | 65.8 | 62.3 |
| Man-M | 31.8 | 30.3 | 29.7 | — | 93.6 | 87.0 | 78.1 | 65.1 | 64.5 | 61.0 | 62.2 | 66.4 | 62.5 | 58.5 |
| Tri-J1 | 29.0 | 28.9 | 27.9 | 71.2 | — | 66.2 | 78.5 | 67.5 | 66.0 | 61.0 | 59.5 | 65.2 | 62.4 | 59.2 |
| Bom-M | 31.4 | 28.0 | 30.0 | 69.5 | 91.8 | — | 78.5 | 65.9 | 67.0 | 60.5 | 60.0 | 65.2 | 64.5 | 58.6 |
| Tri-J2 | 33.8 | 32.2 | 31.7 | 44.9 | 44.1 | 47.5 | — | 67.8 | 68.0 | 63.7 | 60.5 | 65.3 | 63.3 | 58.6 |
| Tri-aJ | 26.7 | 26.1 | 27.0 | 26.0 | 23.8 | 25.1 | 27.1 | — | 78.4 | 65.4 | 64.1 | 63.6 | 64.0 | 62.2 |
| Gal-82 | 26.2 | 27.4 | 28.6 | 26.2 | 25.0 | 25.7 | 29.5 | 45.0 | — | 66.8 | 63.8 | 64.2 | 65.4 | 62.5 |
| Lep-A | 30.5 | 29.1 | 31.0 | 28.5 | 27.4 | 28.2 | 30.4 | 26.8 | 28.7 | — | 67.0 | 62.6 | 66.9 | 63.7 |
| Bla-A | 32.3 | 29.8 | 30.8 | 29.3 | 28.0 | 29.0 | 29.2 | 21.6 | 22.9 | 34.9 | — | 65.0 | 62.4 | 63.0 |
| Cal-A | 27.8 | 25.7 | 29.8 | 25.3 | 23.1 | 27.6 | 27.5 | 22.1 | 25.8 | 28.6 | 27.1 | — | 62.6 | 56.9 |
| Pro-2 | 30.5 | 28.1 | 28.5 | 22.5 | 24.3 | 24.3 | 26.3 | 21.7 | 25.3 | 30.7 | 31.0 | 31.0 | — | 60.5 |
| Hemo | 24.7 | 25.1 | 24.8 | 23.6 | 23.7 | 25.0 | 27.2 | 21.6 | 27.2 | 26.8 | 27.4 | 23.4 | 25.3 | — |

## 第七节 脂肪体对贮存蛋白的摄入和利用机制

有些六聚蛋白是不能被脂肪体摄取和利用的。因此，不是所有六聚蛋白都是贮存蛋白。作为贮存蛋白最基本的特征是它能被脂肪体特异性的识别和摄取。当贮存蛋白在脂肪体内合成以后，接着就释放到血淋巴，几天以后又能被脂肪体摄取。究竟为什么脂肪体能选择性摄取贮存蛋白？事实表明，脂肪体的摄取是一个典型的细胞内吞过程，只发生在化蛹前后短暂的时间内。贮存蛋白在血淋巴中的浓度通常都很高。这种浓度差别可以产生被动扩散，使一部分贮存蛋白进入脂肪体，但无疑存在选择性摄取的复杂机制。

## 1 脂肪细胞的蛋白内吞过程

Lock 与 Collins（1968）在脂肪细胞基础性研究中，他们将辣根过氧化酶（HRP）注射到大芭蕉卷叶弄蝶幼虫体内。在追踪 HRP 从血淋巴进入脂肪细胞的过程中发现，HRP 首先由血淋巴进入脂肪细胞外网状空间的基质中，以后又通过细胞间狭窄通道进入细胞质。在取食阶段，HRP 进入到通道的顶端形成明显的内吞胞。这是 1 种含有大量溶酶体的多胞体，其中有许多水解酶。至预蛹期溶酶体中水解酶的活性停止，HRP 转入到 1 种新的蛋白质贮存颗粒内。随着预蛹的发育，蛋白颗粒在细胞质中大量积存。在红头丽蝇蛹期的脂肪体内，也有类似的结构。从中可以看到细胞的内吞胞和蛋白质颗粒的形成过程。

## 2 贮存蛋白的受体

要在短期内迅速从血淋巴中清除贮存蛋白并积累到脂肪体中，显然不是浓度梯度的功能，这里存在受体的选择性引导等一系列过程。在这个过程中，不排除某些其他含量丰富的血淋巴蛋白进入脂肪体。因为内吞胞腔中经常也会摄取少量的血淋巴。试验发现，当谷实夜蛾的脂肪体在离体条件下，与等量的标记芳香蛋白和外来蛋白 IgG 温育时，少量 IgG 即积聚在组织中，但芳香蛋白的量比它大 10 倍。说明其中存在特异性内吞受体，并且已经在双翅目和鳞翅目昆虫中发现了有关的贮存蛋白受体（Wang & Haunerland，1994）。

### 2.1 双翅目

双翅目昆虫脂肪体中的芳香蛋白受体的发现，可以追溯到 Ueno 等在 20 世纪 80 年代初期的工作（Ueno 等，1983）。他在有关受体的试验报告中指出，麻蝇（*Sarcophaga peregrina*）脂肪体膜的某些区域能结合放射性标记的芳香蛋白，这种结合具有特异性和饱和性特点，糖类不影响结合。但是它与其他动物细胞的内吞过程不同，需钙离子的存在。最适的血淋巴 pH 为 6.5。在以后的研究中，发现黄素蛋白光色素（flavin lumichrome）阻碍芳香蛋白与受体结合（Ueno 等，1987）。有钙离子存在时，光色素与芳香蛋白是按化学比例结合的（每个亚单位对 1 个分子），由此认为，光色素-芳香蛋白结合成复合体，不可能再与受体结合。芳香蛋白受体结合点的分子结构与光色素相类似，它参与受体对芳香蛋白的识别。

芳香蛋白的受体只能在蛹脂肪体中检测到，它不存于幼虫脂肪体中（除非幼虫用蜕皮甾醇进行处理）。根据配体印迹技术测定结果，芳香蛋白受体的分子量为 $120\times10^3$u。另 1 个试验证明，在幼虫体内存在的是分子量为 $125\times10^3$u 的非活性前体，又称为"隐性受体(cryptic receptor)"，经酶切修饰以后才成为具活性的 $120\times10^3$u 蛋白（Ueno 等，1984）。Chung 等（1995）克隆了纯的芳香蛋白受体，从而证实了原先的假设。原来称为"隐性受体"的 $125\times10^3$u 蛋白是 1 种无关蛋白。此外，脂肪体的胞膜制备品中还含有很多蛋白颗粒。由此产生了一个疑问，$120\times10^3$u 受体是否真正膜蛋白的问题或者说它是与芳香蛋白结合成为颗粒的细胞内蛋白。后者可能是一些作者误解，因为在脂肪体细胞膜内，用亲和性抗体没有检测到 $120\times10^3$u 蛋白或交互反应物。有趣的是在幼虫和蛹的脂肪体中测到免疫反应蛋白，虽然只有后者能与芳香蛋白结合。用 Western 印迹鉴定，两种脂肪体含有 3

种免疫反应蛋白，分子量分别为120、76和$53\times10^3$u。幼虫体内能结合芳香蛋白的$120\times10^3$u蛋白的量极微. 最后用氨基酸末端序列分析提供了结论性证据，分子量小的是$120\times10^3$u蛋白的片段。在幼虫脂肪体中，由特异性内切酶把$120\times10^3$u芳香蛋白酶切成两个片段。在化蛹前有20-羟基蜕皮酮存在时，蛋白酶无活性，因此以完整的芳香蛋白的结合蛋白占优势，而且20-羟基蜕皮酮也导致$120\times10^3$u蛋白本身的表达。

受体的cDNA编码1 163个氨基酸，首先是1个粗面内质网靶标序列，随后是$120\times10^3$u芳香蛋白的N-末端序列. 这也是$120\times10^3$u片段的氨基酸序端，该片段长达695个残基。$53\times10^3$u片段起始在713个氨基酸处。从序列中可以看出，它与Maschat等(1990)先前测定的果蝇脂肪体中功能未知的蛋白质(fbpl蛋白)有明显的相似性(29.1%相同，66.2%同源)，与丽蝇中单独测定的芳香蛋白受体，也有46.1%是相同的(Burmester等，1995)

在丽蝇脂肪体膜上，Scheller等在1992年鉴定了3个芳香蛋白的结合蛋白，分子量分别为130、96和$65\times10^3$u，用放射性标记芳香蛋白的直接配体印迹标明，只有$95\times10^3$u蛋白被标记，但3种蛋白都形成囊泡。当印迹的蛋白首先与配体芳香蛋白温育，然后与芳香蛋白体温育(结合配体的免疫印迹是1个比较灵敏的操作步骤)，在离体试验中只有$130\times10^3$u蛋白的mRNA进行翻译。3种蛋白与每种蛋白的特异抗体产生交互反应，由此看来96和$65\times10^3$u蛋白是$130\times10^3$u蛋白的片段。完整的$130\times10^3$u蛋白和$96\times10^3$u蛋白在脂肪体摄取芳香蛋白之前很明显，$65\times10^3$u片段在幼虫生活早期是不存在的，只在摄取芳香蛋白时才开始出现。由于芳香蛋白的摄取与芳香蛋白的$65\times10^3$u结合蛋白的出现受到20-羟基蜕皮酮的诱导，因此Burmester等(1995)认为，$96\times10^3$u蛋白是在脂肪体摄取芳香蛋白之前受到修饰的，并分离出$65\times10^3$u蛋白，可能成为1种有活性的芳香蛋白受体。另外，麻蝇(*Sarcophaga*)的受体与果蝇的fbpl基因序列具有同源性(27.8%相同)，受体也与其配体芳香蛋白有某些相关性(17.8%相同)。

如上所述，麻蝇和丽蝇芳香蛋白的结合蛋白序列有很多相似性(表4-6)。虽然有人认为它们的功能和活性是不一致的，然而从基因序列来看两者是一致的。这两种cDNA 5'-末端含一个粗面内质网靶标序列。Burmestes等(1995)认为是一个跨膜alpha螺旋，在丽蝇和麻蝇受体比较的序列中，是一个很保守的区域(61%相同，85%相似)，说明麻蝇蛋白也存在质膜中。丽蝇中全蛋白为90个氨基酸残基，与通过SDS电泳计算分子量的结果相近。在麻蝇中，经测定酶切点在R713与S714之间。与丽蝇的序列比较接近(在R824和S825之间)。在两个序列中有6个相当保守的氨基酸(RYRRSL)。这是真正的蛋白酶切位点。在丽蝇中经切除形成92和$48.4\times10^3$u两个片段，发现在麻蝇中是切成76与$53\times10^3$u两个片段。在这两个种内还发现受体在没有20-羟基蜕皮酮时是无活性的。对贮存蛋白的摄取有不同的解释。Chung等(1995)认为，20-羟基蜕皮酮阻止$120\times10^3$u蛋白的酶切，保证活性的芳香蛋白完整的与受体蛋白结合，然而Burmester等则提出另1种说法：$96\times10^3$u蛋白被20-羟基蜕皮酮激活，可能再进一步酶切成有活性的$65\times10^3$u受体. 如果酶切在两种昆虫中发生在相同的位置上，则跨膜螺旋体应位于较小的片段上(840～859或937～953)，这将与$96\times10^3$u蛋白或它的$65\times10^3$u片段的受体功能不一致。更应注意到较小的片段比大的更保守。在两种亲缘很近的昆虫中同源蛋白会有不同的调节

作用，可能是试验方法不同的结果。虽然贮存蛋白的摄入受20-羟基蜕皮酮的调节，但如何完成这个过程还了解得不够清楚，芳香蛋白的结合蛋白作为跨细胞膜内存受体虽然已经得到克隆，但是还需进一步深入研究。

**表 4-6 贮存蛋白受体片段比较**

| 麻蝇（Sarcophaga peregina） | | 丽蝇（Calliphora vicina） | | |
|---|---|---|---|---|
| 已报道分子量（u） | 计算所得分子量（u） | 已报道分子量（u） | 计算所得分子量（u） | 麻蝇/丽蝇相同性（%） |
| 120 000 | 132 346 | 130 000 | 148 255 | 46 |
| 76 000 | 81 964 | 96 000 | 99 986 | 40 |
| 53 000 | 50 400 | 未测 | 48 443 | 55 |

麻蝇资料由 Chung 等（1995）报道，丽蝇资料由 Burmester 和 Scheller（1992）报道。并分别根据核酸序列进行计算（仿 Haunerland，1996）。

## 2.2 鳞翅目

在鳞翅目中，已经系统研究贮存蛋白受体的仅谷实夜蛾1种（Wang 等，1993）。受体的性质和定位直接联系到2种不同的脂肪体类型。早期的观察结果表明，芳香蛋白和非六聚体蛋白 VHDL 只贮存于（蛹）的围脏脂肪体中，而不存在于周缘脂肪体中（幼虫），说明特异性摄入只发生于前者。这些芳香蛋白和 VHDL 受体碘放射化合物与脂肪细胞温育，两种蛋白与脂肪细胞间相互作用中出现特异性和饱和度，两者结合常数比较相近，VHDL 为 $7.8\times10^{-8}$，芳香蛋白为 $9.2\times10^{-8}$，而牛血清蛋白不与膜作用，也不影响 VHDL 或芳香蛋白与膜的结合量。在膜与标记的芳香蛋白温育时，若存在过量的非标记芳香蛋白，标记化合物与膜结合的量就比较少。同样，用 VHDL 也减少标记 VHDL 的结合，未标记的芳香蛋白结合量也减少，可以想象这是受体饱和的结果。说明单个受体调变两种结构不同的贮存蛋白的摄入。2种蛋白结合的 pH 为 6.5～7.5，至少需要 4mM 的钙离子，这与丽蝇中观察到的很相似，只是不像双翅目的贮存蛋白那样结合得牢固。

为了纯化 VHDL 的受体蛋白，从围脏脂肪体提取膜蛋白，用 SDS 凝胶电泳分离，样品在中等条件下处理。分离的膜蛋白对 VHDL 仍保持一定的亲和力。将膜蛋白印迹到硝酸纤维素上，可以看出与标记 VHDL 结合的蛋白带分子量为 $80\times10^3$u。Wang 等（1993）用配体印迹分析 VHDL 受体。以一系列色谱步骤，可使受体提纯到同质化，这种受体是碱性的糖基化蛋白，分子量 $80\times10^3$u，等电点高达 pI 8.2。由于标记的蛋白的过量竞争，两种蛋白配体在印迹中结合量减少，但不受血清蛋白的影响，可惜没有搞清贮存蛋白受体是如何识别不同结构的芳香蛋白和 VHDL 的，它可能与2种蛋白的高甘露糖结构有关，并和受体的高正电荷与配体的负电荷之间的离子作用有联系。如果一种贮存蛋白受体能识别多种贮存蛋白而进行摄取是由于糖基化的作用，但富甲硫氨酸蛋白并没有糖基化，也被脂肪体摄取就无法解释其原因；另外，糖基化的核黄素结合六聚蛋白在某些鳞翅目昆虫中也不被脂肪体摄取，可能是核黄素阻止了与受体的结合。Ueno 等（1987）在双翅目昆虫中也观察到这类现象。

用受体蛋白抗体来分析受体在昆虫体内的分布，发现受体蛋白只存在于围脏脂肪体中，而且只在末龄幼虫后半期出现。用电子显微镜和免疫标记技术检测到 VHDL 受体大

多与脂肪体质膜相连，但也存在于蛋白颗粒中，说明它作为细胞内吞受体，受体本身存在时间很短，而且只在浓度高时才能见到。抽提脂肪细胞膜上测定受体蛋白的抗体，只有在末龄幼虫最后 4～8d 才能抽提到。这时膜蛋白上的受体最为显著，与其他细胞内吞受体相比，鳞翅目昆虫的贮存蛋白受体是不循环的，它转化为蛋白颗粒。蛋白颗粒中检测到受体即支持了这种观点（Wang 等，1993）。

用全标记 VHDL 和芳香蛋白，通过活体和离体试验，贮存蛋白的摄入过程如图 4-3，贮存蛋白受体作为一个跨膜蛋白在末龄幼虫时在质膜上合成，它与贮存蛋白的结合点面向血淋巴，包涵素（clathrin）结合点面向胞质。贮存蛋白一旦与受体结合，通过包涵素的作用，形成一个被膜凹陷，以后凹陷逐渐发展，最终成为含有受体与蛋白的囊胞离开质膜，被膜囊胞可能失去包涵素被膜而相互聚合成多胞体，其中含有受体结合的 VHDL 和芳香蛋白、受体、膜以及某些血淋巴蛋白，共同包涵在胞腔中。多胞体随即与溶酶体融合，水解酶消化膜组分和受体，形成电子致密颗粒。几天后逐步消化 VHDL 颗粒，只留下芳香蛋白，形成新的结晶。这时芳香蛋白受到保护而不为酶所水解。在预蛹发育过程中，蛋白酶水解一部分芳香蛋白颗粒为蛹提供所需的氨基酸，大量剩余的芳香蛋白一直保存到成虫期，在卵粒形成时作为氨基酸库。

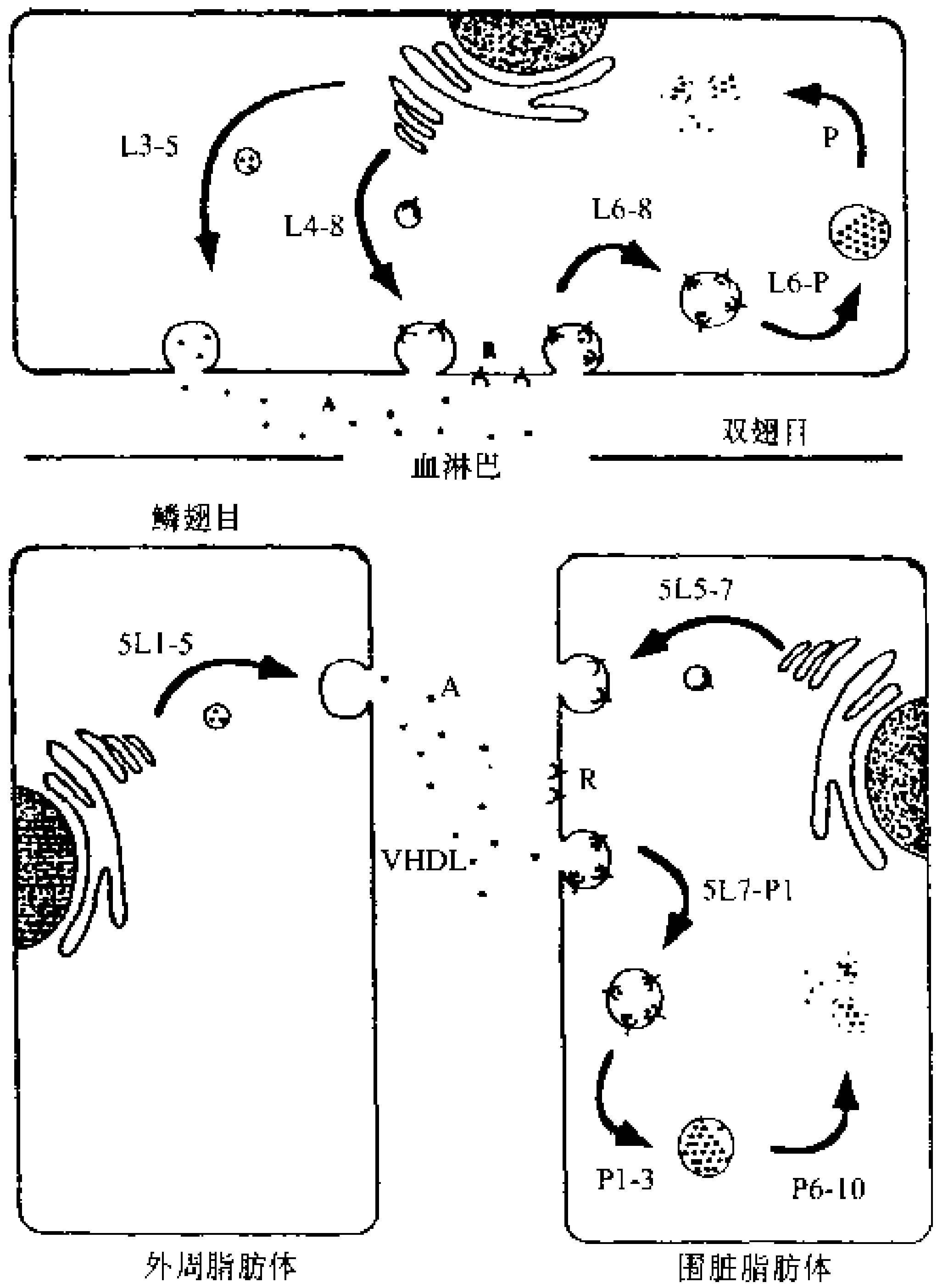



图 4-3 昆虫贮存蛋白摄取和利用模式

L3—5，L4—8，L6—8：丽蝇幼虫孵化后为 3～5，4～8，6～8d；5L1—5，5L5—7，分别为谷实夜蛾末龄幼虫蜕皮后 1～5，5～7d；P1—3，P6—10d A. 芳香蛋白 R. 受体 L. 幼虫 P. 蛹 字母前数字示龄期，字母后数字示日龄

双翅目根据 Burmester 等（1995）红头丽蝇材料，鳞翅目根据 Wang 和 Haunerland（1994）谷实夜蛾资料

谷实夜蛾的受体还有许多问题没有搞清，例如受体如何识别富甲硫氨酸蛋白等类贮存蛋白。其他鳞翅目昆虫的贮存蛋白受体的情况如何？也有待进一步研究和揭示。

# 第五章 昆虫的热激蛋白

昆虫体内除结构蛋白以外，与生长发育有关的贮存蛋白，与生殖有关的卵黄蛋白和雄腺附腺蛋白分别在其他章节中叙述。在环境胁迫下的热激蛋白，也是十分重要的蛋白。本章扼要介绍热激蛋白。

热激又称热休克（heat shock），是指生物体在遭遇高温时迅速产生的一种应激反应。昆虫遭受热激时正常的蛋白质合成受到抑制，而另一类特殊的蛋白质却得到诱导，这类蛋白质即为热激蛋白，或称热休克蛋白（heat shock proteins，HSPs）。热激蛋白也能被化学物质或其他环境刺激所诱导，但在习惯上这些蛋白统统被称为热激蛋白。热激反应和热激蛋白早期是在果蝇中被发现的。多年来研究表明，它广泛存在于生物界中，其中包括细菌、真菌、藻类、植物、昆虫和哺乳动物。

## 第一节 热激蛋白的结构与功能

早在20世纪30年代中期，Goldschmidt（1935）研究了果蝇体内热激对基因表达的影响。他通过热激蝇蛹，使其发育产生类似于突变那样的缺损。1962年Ritossa发现，短暂的热激诱导黄猩猩果蝇（*Drosophila melanogaster*）唾腺上的多线染色体发生膨突（puffs），同时发现2，4-二硝基酚或水杨酸钠导致了3个新的膨突。以后Berendes和Ashburner分别用热激和化学试剂诱导果蝇染色体产生膨突，认为新膨突的诱导非常迅速，而且短暂，当果蝇从25℃移到30℃时，30min便使膨突达到最大程度。即使是分离的器官也能诱导染色体发生膨突。

至20世纪70年代，根据发育中受到热激对基因表达的影响，以及热激诱发唾腺染色体产生膨突的实验结果，Tissieres等

（1973）发现了热激蛋白，当时观察结果是：将果蝇预蛹加热到 37.5℃，温育 20min，就在预蛹组织中获得了一类新型的蛋白质。利用 SDS—PAGE 分析果蝇唾腺中由导入的同位素标记氨基酸所合成的放射性蛋白质。热激前各种组织合成不同的蛋白质，但热激时出现了相同的蛋白质。1975 年 Farrell 改进了双向电泳，大大提高了分辨能力。这一方法的应用，推动了以后对蛋白的研究，并完成了热激蛋白基因克隆和序列分析。早期克隆了 7 种主要热激蛋白的基因，并进行了测序。热激蛋白基因命名统一按缩写字母 hsp 表示，大写字母 HSP 表示相应的蛋白质（也有用相反形式表示的），后面加上分子量，用来表明各种特定的热激蛋白。例如 HSP70 表明该蛋白分子量为 $70\times10^3$u，相应的基因为 hsp70。

研究热激蛋白的对象除果蝇以外，现已发展到大芭蕉卷叶弄蝶（*Calpodes ethlius*）、地中海实蝇（*Ceratitis capitata*）、白纹伊蚊（*Aedes albopictus*）、印度谷螟（*Plodia interpunctella*）、非洲飞蝗（*Locusta migratoria*）、美洲大蠊（*Periplaneta americana*）、烟草天蛾（*Manduca sexta*）、蜜蜂（*Apis mellifera*）、拟麻蝇（*Sarcophaga crassipalpis*）、摇蚊（*Chironomus thummi*）、舞毒蛾（*Lymantria dispar*）、云杉卷叶蛾（*Choristoneurna fumiferana*）、沙漠蚁（*Catagyphis bombycina*）、粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）和褐飞虱（*Nilaparvata lugeus*）等。各种昆虫的主要热激蛋白见表 5-1。

**表 5-1　昆虫的主要热激蛋白类型**（单位：$1\times10^3$u）

| 昆虫种类 | 热激蛋白（HSP） | 文献作者 |
|---|---|---|
| 黄猩猩果蝇（*Drosophila melanogaster*） | 82，72，70，68，27，26，23，22 | Lindgist（1980） |
| 摇蚊（*Chironomus thummi*） | 90，72，70，68，34，25 | Vincent & tanguay |
| 麻蝇（*Sarcophaga bullata*） | 115，82，65，29，27，23 | Bultmann（1986）Joglin（1990） |
| 地中海实蝇（*Ceratitis capitata*） | 87，69，34，20，16，14，13，12 | Stephanon et al.（1987） |
| 伊蚊（*Aedes albopictus*） | 90，82，76，66，24 | Carvalho and Rebello（1987） |
| 大芭人蕉卷叶弄蝶（*Calpods ethlius*） | 95，81，74，70，68，25，33 | Dean and Atkinson（1983） |
| 家蚕（*Bombyx mori*） | 83，80，74，70，68，25，23，22 | Evgenev et al.（1987） |
| 烟草天蛾（*Manduca sexta*） | 84，73，71，27，25，23，22 | |
| 美洲大蠊（*Periplaneta americana*） | 83，70，68，28 | Ruder et al.（1987） |
| 飞蝗（*Locusta migratoria*） | | Baldaia et al.（1987） |

## 1　热激蛋白的结构与分类

热激蛋白的结构比较保守，特别是 HSP70，其 N—末端大约有 450 个氨基酸残基的高度保守区，其中有 1 个 ATP 酶的结合区，C—末端约 200 个氨基酸残基是保守程度较低的肽链结合区。

从研究黄猩猩果蝇的热激蛋白开始，研究者根据分子量大小和诱导合成的温度范围，将热激蛋白按主要成分和次要成分分类。主要成分可以明显地分成三族。第一族中有 HSP83（包括 HSP82/84），这是一类最常见的热激蛋白，在 25℃ 时各组织和细胞系均能合成。在哺乳动物中以 HSP90 为代表，与 HSP85 同源。HSP85 与脊椎动物的 Src 基因产物酪氨酸羧化激酶一起会发生沉降。由于 Src 与细胞癌化有关，这就意味着热激蛋白参与癌细胞的代谢或使其结构发生变化，因此引起人们的兴趣。第二族热激蛋白是 HSP70，通常认为它的含量高，而且是在高强度热激时产生的，因此成为主要的热激蛋白，并与多种植物或动物组织在热激时产生的蛋白质同源。本族内还包括 HSP72。那种 hsp70 基因产

物的氨基酸序列分别在染色体上 87A 与 87C 区编码，已经测得相应的 DNA 序列。87C 编码的蛋白质的确切分子量是 70.270u。第三族都是小型热激蛋白，包括 HSP21～28，它们均在染色体 67B 区编码。Mirault 等人认为，它们之间小分子肽型是有区别的。Ingolia 等已对 4 种小肽的基因进行测序，结果表明它们之间有很大的同源性。每种蛋白的 C—末端非常相似，分子量的差异是由 N—末端缺失造成的。令人关注的是这些蛋白中最保守的区域与牛的 α 晶体蛋白亚单位有 40% 的同源性，都是哺乳动物眼内晶体结构蛋白，并在体内大量聚集。说明热激蛋白的保守区参与了 Arrigo 观察到的 SDS 小型热激蛋白的集合体中分子间的相互作用。

## 2 热激蛋白的功能

根据热激蛋白的功能，把它分为热激相关蛋白（heat shock cograte proteins，HSC）和热激诱导蛋白（heat inducible proteins，HSP）。前者呈结构性表达；后者与 ATP 有很高的亲和性，可以诱导靶标蛋白、两者都参与细胞代谢。

HSP 主要类群在进化上具保守性，表明它在有机体生存过程中具有极其重要的作用。不少 HSP 可与细胞膜结合，增强细胞从极端环境中恢复的能力。HSP 在昆虫体内不同时空的动态变化，也表明它是调节昆虫生长发育非常重要的角色。拟麻蝇 3 龄幼虫在脑和肠细胞中合成 HSP65，至蛹期变为合成 HSP72；3 日龄的雄性成虫，其脑和肠的细胞中虽然继续合成 HSP72；但生殖腺和飞翔肌却合成 HSP65。从而可以看出 HSP 的合成与生长发育有密切的关系。

热激条件下产生的 HSPs 可以提高昆虫的耐热力。耐热力获得的速度与 HSP 积累速率呈正相关。耐热性的下降与 HSP 的降解同步；昆虫通过化学诱导产生的 HSP，同样也有提高耐热力的作用。一些昆虫在遭低温或高温刺激时都能诱导热激蛋白的合成。在拟麻蝇中非滞育蛹在 -10℃ 或 43℃ 中处理 2h，大量合成小分子的 HSP23，因而使蛹的耐寒与耐热能力明显提高。但随着蛹进入滞育期，合成 HSP23 的 mRNA 表达增加，因此滞育蛹对环境温度变化有很大耐力（Yocum 等 1998）（表 5-2）。

**表 5-2 主要热激蛋白的已知生理功能**

| 热激蛋白 | 重要生理功能 | 目标多肽 |
|---|---|---|
| 大肠杆菌 DnaK/KnaJ70×10³u | 参与蛋白复合物的再组装<br>稳定未折叠的蛋白质 | DNA 复制复合体外来蛋白 |
| 真核生物 HSP70 | 完成运输、稳定基质中已折叠的结构 | 线粒体前体物 |
| 真核生物 HSP60 | 稳定已折叠的结构，将前体再运回膜间隙 | 基质中前体物 |
| 真核生物 HSC70 | 稳定已折叠的结构 | 新生多肽链 |
| 真核生物 HSC70 | 阻止运输前折叠 | 线粒体的前体和运输前体 |
| 真核生物 HSC70 | 将蛋白质运到溶酶体中去降解 | 老化蛋白 |
| 脊椎动物 HSP70 | 稳定受体非活性形式 | 甾类激素的受体 |
| 脊椎动物 HSP90 | 稳定蛋白质的亚基 | 肌动蛋白和微管 |
| 真核生物 HSP70/HSC70 | 保护热变性的蛋白质 | 前核糖体 |

Laskey 等人提出 HSP 充分当“分子伴侣（molecular chaperone）”的作用。它的主要功能是在细胞内多肽折叠、组装和解组装时作为辅助蛋白，能识别和稳定部分已折叠的中间体，指导蛋白质的初始折叠，对已解除折叠的进行再折叠。此外，它阻止非生产时发

生折叠，调节寡聚态大分子的组装。分子伴侣的这种作用并无专一性。实际上 HSP70 族和 HSP60 族中一些蛋白都有这种功能。分子伴侣是进化上十分保守的蛋白质，包括一定结构上不相关的蛋白家族，另有文献报道，HSP100 与 HSP90 也属“分子伴侣”。遗传研究和生化分析的结果表明，HSP 与核糖体上的新生多肽链结合，维持细胞质中内质网和线粒体运输成分的构像，对保持细胞的运输功能十分重要。热激相关蛋白同样参与蛋白质的运输过程。分子伴侣能防止蛋白变性不可逆聚合而失去功能，有些胞溶性 HSP70 还与其他蛋白质协同发挥作用，使一些不适宜的蛋白质受到阻碍，提高蛋白质合成效率。新近研究结果还证明 HSP70 在蛋白质从细胞质向细胞核内运输时也是必要的。

热激蛋白以另 1 种功能与细胞从蛋白变性胁迫中恢复过来有关。已知 HSP70 结合 ATP 的亲和性很高，并显示出含有弱的内源 ATP 酶活性，而且可以通过与靶标蛋白的结合而被诱导出来。HSP70 不仅可防止蛋白质在高温下发生变性，并可阻止随后产生的不良效应，由此说明，它具有保护变性蛋白功能域（functional domains）的作用。

HSP90 也是高度保守的类群。在真核生物中，它们的同源性大于 50%。在果蝇中已发现 1 个与脊椎动物的 HSP90 明显同源的 cDNA。没有甾醇类激素时，HSP90 与许多其他蛋白一起结合在膜受体上，激素与受体的结合使 HSP90 脱开，人工移除 HSP90 可使 DNA 与受体结合。表明 HSP90 对受体具有空间阻碍作用。与 HSP70 相比，HSP90 还能通过与已折叠的蛋白质的结合来调节这些蛋白质的功能，结果造成空间障碍或改变受体的构型。

据报道，分子伴侣具有几大特征：①同类分子伴侣在生物体内有显著的相似性和保守性；②许多基因在受胁迫和未受胁迫的细胞中表达；③行使功能时，需要水解 ATP 以改变构像，释放底物；④能识别曝露的未折叠结构或变性蛋白结构，无序列偏爱性．这些特征在果蝇或其他昆虫细胞内的分子伴侣中也同样存在。

## 2.1 热激的生理作用

研究发现，热激之后使果蝇生长变慢，产卵量下降。虽然还不知道其中热激蛋白有效作用，但是，可以看出生物体在热激应答中需要付出相当大的代价，甚至影响到下一代。

有大量详细证据表明，热激蛋白对热激后细胞的生存和防止热打击或防止各种化学物质引起的发育缺陷中均起重要作用。

### 2.1.1 对生存的作用

饲养果蝇的最高温度是 29℃，细胞长期处于诱导热激蛋白合成的温度下会全部死亡。然而幼虫和成蝇能经常暴露在 30℃ 以上的环境中仍能存活，因此，必定需要某种适应机制，有利于在短期高温中生存。短期高温处理后蛋白质恢复合成的动力学曲线表明，热激蛋白在该过程中起重要作用。通过一个 35℃ 以下的短期非致死处理，诱导的热激蛋白能防止连续高温刺激产生的致死作用。对果蝇而言，保护性生存的温度是 34℃，在 31℃ 和 37℃ 时，果蝇都会减少一半个体，这种选择包含着某种条件，在该条

件下热激蛋白和组织特异性蛋白同时被合成。胚层细胞形成前期热激蛋白诱导不充分，因此比成体对热更敏感。原肠胚细胞暴露于二苯乙内酰脲或香豆酸（二者均能抑制正常细胞分化）之前在35℃热激培养35min，能增强细胞的存活率。Li等（1981）用哺乳动物细胞研究证明，通过缺氧和亚砷酸钠诱导的热激蛋白也能提高细胞在热激后的生存能力。

### 2.1.2 对表型模拟的作用

在高温热激前用温和温度处理可避免发育缺陷。说明特定的结构缺陷是由热激造成的，温和温度能预防热激的伤害。表型模拟（phenocopy）的研究曾经为研究热激蛋白功能提供了途径。Goldschmit早在1935年研究发现，在果蝇蛹发育的特定阶段给以热激能诱导成蝇中产生异常表型。因为许多异常与已知的突变相似，故称之为“表型模拟”。这种异常成蝇也可由各种化学处理诱导产生。Gloor（1947）曾对热激的程度以及它的生理作用，进行了非常卓越的实验。该实验表明，受精后给果蝇胚热激4h时，产生的成蝇是4个翅而不是2个翅。由此可见双胸突变复合体是在胚胎发育早期被诱导的。以后研究表明，诱导敏感期仅10min，而且是在受精后4h。双胸表型模拟是在胚细胞自身基因开始表达的早期和对热激产生反应的起始阶段被诱导的，但大多数表型模拟是在蛹发育的特定阶段诱导产生的，这种翅着生位置的变化与肌肉发育的突变相似。另一种表型模拟是产生淡黄色，它涉及到体内酚氧化酶的失活问题。多种缺陷类型与突变的相似性以及特定的敏感期都表明“表型模拟”是由于发育的特定时期基因表达发生故障造成的。王荫长等研究发现，在鳞翅目夜蛾科中，无论棉铃虫、小地老虎或黏虫，热激均能诱导精子缺陷，特别是鞭毛中微管受损最为明显。

细胞中合成的热激蛋白和发育过程中许多效应与蛋白质合成的调控有关。热激蛋白功能的研究有助于了解基因的表达与调控机理。用抗体定位热激蛋白和确定细胞中与之相关的因子，分离热激基因表达发生的突变体，都有助于确定这些蛋白质的功能。

## 第二节 热激蛋白的合成

许多生物在最适温度以上受热诱导，能合成一系列热激蛋白。受热以后的果蝇，细胞内hsp70的mRNA水平提高1 000倍，激发其转录的启始。

### 1 合成模式

生物体内大多数细胞在没有任何应激条件下就存在HSPs。分子生物学的研究证明，这些蛋白质是细胞正常生长所必需的，但在热激反应中，不同种类的HSP显示出不同的合成模式。

（1）HSP83在正常温度下培养的细胞中，显示出持续合成的特征，很容易用SDS—PAGE检测到，甚至在胚胎发育早期即已存在。后来研究发现，HSP83的mRNA在母体生殖腺中即能得到诱导，并能传递到正在发育的卵母细胞中，保留到胚胎发生，直到囊胚形成。

(2) HSP70在正常温度下培养的细胞中含量极少，只有通过免疫反应才能检测到。在卵母细胞、滤泡细胞和早期胚中并不合成mRNA，即使热激时也无反应，但是它的同族HSP68能在常温下合成。

## 2 诱导条件

在热激过程中，每种热激蛋白都有自己的最佳诱导温度，即最高诱导速率的温度范围。在果蝇中，HSP83的诱导温度范围最广，大量诱导时所需的温度最低，相反HSP70和HSP68的诱导温度要高得多。

当温度增加到31℃时，果蝇细胞中所有热激蛋白的合成似乎同时被诱导。31～35℃时，HSP和普通细胞蛋白同时合成。当温度升至35℃以上时，非热激蛋白的合成被选择性的抑制，但在不同细胞内被热激抑制的程度不同；当温度继续升高时，热激蛋白的合成也被抑制，首先是HSP83和小型热激蛋白，当其他蛋白合成均停止时，HSP70的合成仍能继续。当温度由40～41℃恢复到25℃时，细胞中开始有少量蛋白质合成。随着一般蛋白质的合成的恢复，热激蛋白mRNA就像在37℃细胞中看到的那样选择性地转译，其中HSP70最先合成，然后是其他热激蛋白。温度降至25℃时，细胞质中蛋白质合成完全恢复，小型热激蛋白的合成达到最大量。几小时后，热激蛋白合成才告停止，只合成原有类型的细胞蛋白质。在恢复期，蛋白质合成的抑制导致热激蛋白mRNA的合成并累积到正常水平。在没有热激蛋白合成时，正常mRNA产物没有恢复。这些结果使Lindquist及其同事设想：热激蛋白通过某种反馈机制参与正常转录的恢复，调节蛋白质合成并减少HSP的mRNA。

冯从经等（1998）用34～38℃热激，在褐飞虱体内诱导出15种HSP，除HSP70以外、HSP90族中有5种，其他均属小分子肽。

大多数组织和细胞系通常能合成少量HSP83，在正常温度下不合成HSP70。然而在成蝇中，25℃时与hsp70有70%同源性的能够表达。20世纪80年代还发现在正常发育中合成了一些小型热激蛋白。如Cheney（1981）报道，在幼虫翅芽中合成了HSP22，它的合成在蛹前期大量增加，在幼虫末期和蛹中发现了HSP22和HSP26的mRNA，但在较老的蛹中却没有。成虫卵巢和胚胎的前囊胚层中也发现了HSP26/28和HSP83的mRNA。这些结果都表明，至少部分编码小型热激蛋白的基因在正常发育中表达。HSP22和HSP26在预蛹期的表达也许是对蜕皮甾醇的1种反应，HSP22，23，26和27 4种小型热激蛋白能在有核细胞和成虫器官芽中用20羟基蜕皮酮诱导合成。这种诱导作用是增加RNA的合成水平。

热激蛋白的合成能被多种试剂诱导，如醇、氟化物、氰化物和某些重金属、二硝基苯酚以及缺氧和脱离缺氧、高浓度二氧化碳都有诱导效应。

几种小型热激蛋白在早期胚胎的原代培养中也可由致畸剂诱导合成，用分离的原肠胚培养20h后，分化出可辨别的肌肉和神经节，分化过程可被包括香豆酸、二苯乙内酰脲和乙烯雌酚等多种致畸剂诱导，合成3种最小的热激蛋白（21～23）$\times 10^3$u。这种小型热激蛋白被如此广泛的化学物质所诱导，表明它们可能从化学诱导压下对细胞起某种保护作用。

### 3 细胞定位

由于脱离缺氧条件和氧化磷酸化的各种解耦联剂均能诱导热激蛋白的合成，曾有人试图在线粒体上定位该种蛋白质，但 Arrigo 和 Velazquez 领导的两个小组在 20 世纪 80 年代初最终否定了这种看法。Michell 等（1975）早期的研究表明，热激蛋白首先出现在细胞核中，这些结果后来被几个研究者所证实。Arrigo 的工作意义重大，因为他提出新合成的热激蛋白 HSP83、HSP70、HSP22、HSP23、HSP26 与 HSP27 都是先出现在细胞核中，当温度从热激状态恢复到 25℃ 时，热激蛋白进入细胞质中，并以 30S 聚集体存在，再次热激以后，它们又迁回细胞核中。确定这些物质在细胞核中的位置是非常困难的。因为在加热后，它们会与核呈特异性结合。热激蛋白从核中释放需要核酸酶的消化，在这些条件下，热激蛋白与染色体紧密结合。热激蛋白在核中的功能是调节转录或在热激时稳定结构。小分子量热激蛋白在核中以信使核糖核蛋白体形式存在或与核骨架结合或以 mRNA 加工过程中的核糖核蛋白体的颗粒形式存在（表 5-3）。

**表 5-3 双翅目昆虫热激蛋白的细胞内定位**

| 热激蛋白 | 昆虫 | 位置 | 特性 |
|---|---|---|---|
| HSP83 | 果蝇 | 细胞核、细胞质 | 温度下降时由核释入胞质中 |
| HSP80 | 摇蚊 | 细胞质 | |
| HSP68～70 | 果蝇 | 细胞核、细胞质 | 随温度和应激的性质而变化 |
| HSP34～36 | 果蝇 | 细胞核 | 低盐浓度下可溶 |
| HSP22～28 | 果蝇 | 细胞核、细胞质 | 随温度和应激的性质而变化，高盐浓度下不可溶，抗核酸酶处理 |

## 第三节 热激蛋白的基因

### 1 分类

许多生物的热激蛋白基因都有过研究，最为详细的是果蝇。果蝇热激蛋白基因分为 3 组，每组基因在染色体中有特别的结构和典型的产物。

第一组是 hsp70 族，包括 hsp70 和 hsp68。hsp70 有 3 个拷贝，位于染色体的 87C1 位点上。在应激条件下，hsp70 可扩增 100～1 000 倍，成为一个极大的基因产物，但在进化上非常保守。hsp68 有 1 个拷贝，位于染色体的 95D 位点上，与 hsp70 分享一段很长的同源序列。此外，还发现有几个基因与 hsp70 有同源性片段，分散于基因组中，但不在已知的热激位点上，热激对它们无诱导作用，在进化上亦非常保守。

第二组是 4 种小分子量热激蛋白的基因：hsp27、hsp26、hsp23 和 hsp22。它们彼此密切联系，成簇分布，单拷贝，长 12kb，位于染色体的 67B 位点上，估计在热激条件下，可扩增 20 倍，但实际上各基因的诱导程度差别很大。在双翅目果蝇与麻蝇之间许多小热激蛋白的氨基酸序列有许多相同区域，存在明显的同源性（图 5-1）。

第三组是 hsp83/84 基因。位于染色体的 63BC 位点上，编码 $83\times10^3$u/$84\times10^3$u 蛋

白。在非应激条件下，HSP83 作为正常的细胞蛋白也能检测到，诱导时只能增加几倍，主要位于细胞质中。在高等动物中与 $83\times10^3$u 相对应的可能是 $90\times10^3$u 蛋白质，在 HeLa 细胞中有（90～100）$\times10^3$u 的 3 种蛋白质，它们之间是否相互联系或起源于 1 个或几个基因尚未搞清。

```
ScHSP23   MAGLPLLLSLIDELD---RESNPSYYGNDFGLGLSP---YLIHRQPQREPAHNLVGYSLPLSLLSRLNEHQVARR
DmHSP27   *·I·*·**H*AR***HDY*TDWGHLLE·***·*·H·HDL·H-P*RLLLPNTLG*GRRRY·PYEP*·G··  *··**
DmHSP26   *·-*·T****·***·---EPR·*I*----·****H*HSR*··PLGT*·RR·I*GCPC·S*·CPS*PAC VLAL**
DmHSP23   **N *****A*·*----*M*MV··*E---------*---*YC·**--*·*YLA***    *·EQQL*QL*K**·AS
DmHSP22   *R·**··WR·A·*·AR------M·RL··P*------HAF·HEPP--------------------·V·SVALPRN··

ScHSP23   GGEKKEG----RVSPVGKDGFQVCMDVAQFKPSELNVKVVDNCI-VIEGKHEEREDQHG FIQRHFVRRYVLPKG
DmHSP27   ··GGP··L------·*************·****·**T*****T·-*·**********G**·M*******  *T***
DmHSP26   EMA····IHWPAT·H****************************·**-·*********·*·**·H*M*******K *D*
DmHSP23   ·*SS--*----A**K·************·*******V***Q***-·-·**·******·**-**T*******A**P*
DmHSP22   HIARW·EQELPPP·T*N****···T·**K·-–***·***·*·S·V··*·*S*··*A··*G·SS***  **·***E*

ScHSP23   YDADKVVSTLSSDGVLTVSVPKPQE-EEKSNERVIQIQQTGPAHLNVKQNTQEK---VGDGANGEPQEEKK
DmHSP27   ·*··E****·*******·KA*P*PSK*·AK·**··***********·**AP·P*AGDGK··N···**KM*TS*
DmHSP26   *K*··***Q**********·****AV*·**·**·*****V********A*ES*V-- K*KENG -*·GKD*
DmHSP23   *·****A**********·K****PAI*·*·***··****V*********-*P·*A---*E··NGN---  -*
DmHSP22   *·****T**********·***·*PGV·*TL·**E·T*·***E·AK·SA··P··*TAS-----------  ·
```

图 5-1　拟麻蝇（*Sarcophaga classipalpis*）HSP23 和黄猩猩果蝇（*Drosophila melanogaster*）小热激蛋白氨基酸序列比较

★示相同氨基酸　·示化学性相当的替代氨基酸　—示插入或消失　横线区为 α-晶体域

（仿 Yocum 等，1998）

用 $^3$H-尿嘧啶标记热激条件下转录的 mRNAs，发现热激基因转录快，翻译也快。热激基因最明显的特点是除 hsp83 或 hsp70 外，可能都不含内含子，转录后加工 RNA 不需拼接。

## 2　基因的结构

### 2.1　在染色体上的位置

在黄猩猩果蝇中，除 33B 膨突外，大多数热激膨突位于第 3 染色体上。因为一开始描述了 9 个热激位点，在单向凝胶上显示了 8 或 9 种热激蛋白。因此，当时推测 1 个热激膨突编码 1 种热激蛋白。这种推测在两种热激蛋白（hsp83，hsp68）中显然是正确的，hsp83 是 63BC 的一个单拷贝序列编码的，hsp68 结构基因在 95D 也只有 1 个拷贝。然而，已研究的其他热激蛋白是由热激基因的多拷贝编码的，HSP70 有 2～6 个拷贝，分布在两个热激膨突位点 87A 和 87C 之间。至少有 4 种小型热激蛋白是 67B 膨突的 12kbDNA 片段编码的。93D 膨突最大也是由几种试剂所诱导而独立于其他膨突。Lengyel 及其同事（1980）的研究表明，与 87A 和 87C 膨突不同，93D 编码的 RNA 主要位于细胞核中。

1970 年 Ashburner 描述了 70A，64F 和 33B 膨突。此外，还有些其他小膨突，包括第 1 染色体上的 10F，第 2 染色体上的 54E 和第 3 染色体上的 63F、73B 和 88B，其中一些膨突只编码少量热激蛋白的序列。

87A 和 87C 编码 $70\times10^3$u 热激蛋白的基因已经进行了广泛的研究，其中以经典遗传学和分子遗传学相结合最有效。用 87A～C 区缺失的方法观察热激后有无 HSP70 的合成，发现 hsp70 基因具有多拷贝。在热激多核糖大颗粒上 hsp70 的信使非常丰富，已被几个实验室用来分离在 87A 和 87C（包括 hsp70）编码区的 DNA。87A 膨突通常包括两个拷贝的 hsp70 基因，中间有 1.7kb 隔开。87C 区有两个拷贝方向相同、位置接近的 hsp70 基因，还有第 3 个 hsp70 基因的拷贝，方向与前二者相反，且相距大约 40kb，编码区之间的大部分 DNA 是多拷贝的 αβ 重复序列。该序列在黄猩猩果蝇中是热激后表达的，但另 1 种果蝇 *Drosophila simulans* 中当该序列不在 87C 区时，它的表达显然不需热激反应，因此不是热激后表达的（图 5-2）。

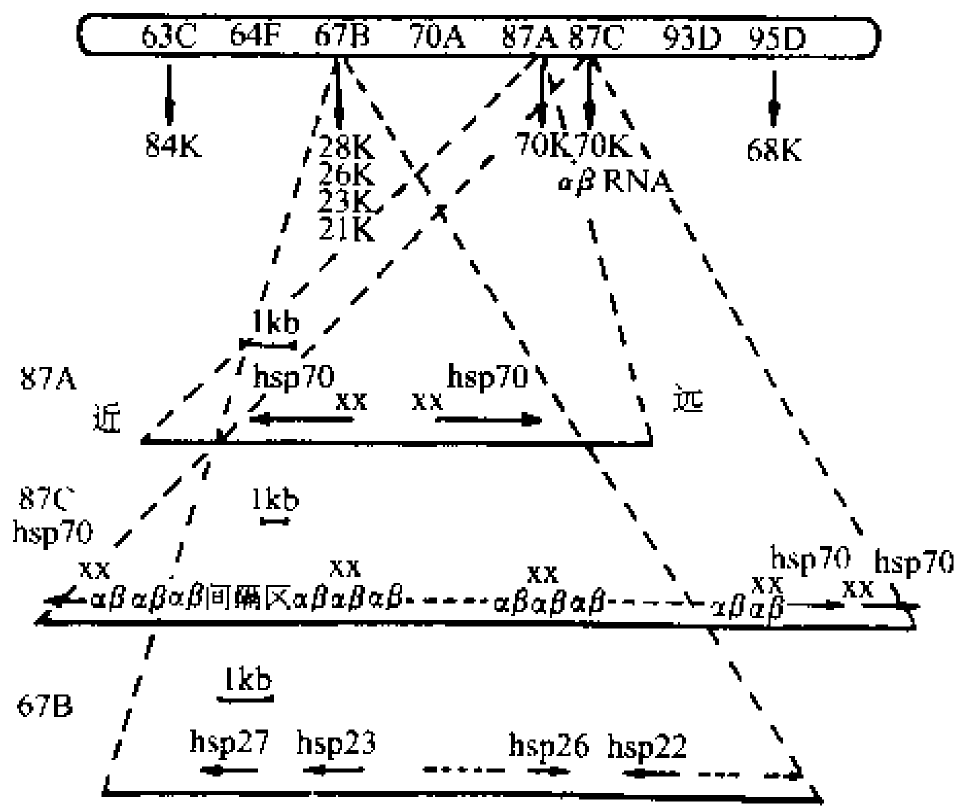



图 5-2　黄猩猩果蝇第 3 条染色体上热激蛋白基因图解

→示转录方向　…→示发育表达基因

××示 αβ 基因

（仿刘惠霞等，1998）

## 2.2　果蝇的 hsp 结构

通过测序发现在 hsp70 基因 mRNA 转录起始点上游 30bp 处都有 1 个 TATAATA 特定序列和 1 个预定 mRNA 帽序列，所有 hspmRNA 都有 1 个长的 5'端非转译区段，在 hsp70 基因中这个区段的长度大约是 250bp，hsp70 基因在转录区上游有约 350bp 的同源区，在 αβ 序列中也发现有该同源序列和 mRNA 编码序列，最初的 64bp 在热激后表达，因此，推测这些序列在热激后调节转录时起重要作用，其结果与前面提到的转录数据一致。与带有同一编码蛋白质的多拷贝区的 87A 和 87C 膨突相比，67B 膨突至少编码 4 种不同的热激蛋白。在这个基因族中还有 3 个基因在预蛹期表达，但对热激没有反应。小型热激蛋白间虽有差异，但编码区有大量的同源区段，因此它们之间也许不是功能上而是进化上的差异。在考察编码区外的序列对热激后基因表达的影响时，发现在这些基因的转录起始点上游都有一个大约 200bp 的序列（ACTTTNA），这些序列都与转录调控有关。

热激编码区有几个重要的特征。在 5 个热激基因（hsp83、hsp70、hsp68、hsp26 和 hsp23）的转录起始点上游 50bp 有 1 个二重对称区，对 hsp70 基因的表达很重要。所有信使都有 1 个 5'端非转译区，含有将近 50％的腺嘌呤，这一特性可能与转录或翻译或对二者都有关系。另一个重要的特征是，除 hsp83 外，所有 mRNA 都没有间隔序列，使在较高温度下加工 mRNA 时免受损伤。

黄猩猩果蝇的hsp70基因的排列似乎是几种蝇类的典型代表。其他果蝇（*Drosophila mauritiana* 和 *Drosophila simulans*）都有两个反向重复的hsp70基因。黄猩猩果蝇的87C位点最不具代表性，似乎是αβ重复基因插入该区产生的。有一个较近缘的果蝇种（*Drosophila pseudoobscura*）也有两个编码hsp70的膨突，而hsp83的膨突位于X染色体上，它的表达具有剂量效应。

### 2.3 粉纹夜蛾的hsp结构

Schelling等（1996）由粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）5龄2d幼虫多聚腺苷酸RNA所构建的cDNA文库，得到了1个cDNA克隆。据推断，该cDNA含有编码整个蛋白质的序列。在2 194个碱基对组成的序列中含有1个由1 983个碱基对组成的开放式阅读框架，它起始于5'端的第91位碱基（即甲硫氨酸密码子的第1个碱基），所编码的蛋白质含有661个氨基酸。紧靠开放阅读框架末端终止密码子的下游是一段由99个碱基对组成的不翻译区域。从该克隆的多聚腺核苷酸信号和1个多聚腺核苷酸残基序列（trock），判断它是插入了整个3'端的不翻译区。将粉纹夜蛾hsp70家族中各成员所编码的氨基序列与基因文库中其他物种的hsp70所编码的序列进行比较，发现它们是高度同源的。与黄猩猩果蝇热激相关蛋白4个基因的同源率高达85%。

为测定hsp70成员在粉纹夜蛾基因组中的拷贝数，在高度严紧的条件下进行了索森（Southern）印迹分析。用该家族成员cDNA克隆5'端的1 100个碱基对片段作探针，探测了粉纹夜蛾基因组DNA的限制性消化产物。杂交冲洗后，4种消化产物各观察到1个信号。在该分辨率水平上，表明粉纹夜蛾hsp70cDNA在基因组中是由单拷贝基因所编码的。

## 3 基因表达的调控

虽然热激蛋白基因的表达可以在转录后和翻译起始水平上进行调节，但在多数细胞中，基本上发生在转录水平上。

热激反应的调控机理在原核生物中主要是用大肠杆菌进行研究的，以后对果蝇的研究结果表明，在转录水平上的调控涉及存在的热激转录因子（heat shock transcription factor，HSF），及其与热激蛋白基因转录启动区内热激应答元件（heat shock element，HSE）的结合与解离，在非应激条件下HSF处于无活性的单体状态，在遭热激时形成具有DNA结合活性的HSF三聚体（图5-3），并与热激基因启动区中的热激应答元件结合，激活该基因的转录，产生大量热激蛋白。热激蛋白的积累有可能反馈抑制HSF三聚体的活性，使之解聚为单体。在此过程中某些细胞因子和调节酶可能参与调节。热激蛋白调控基因表达的机制见图5-4。

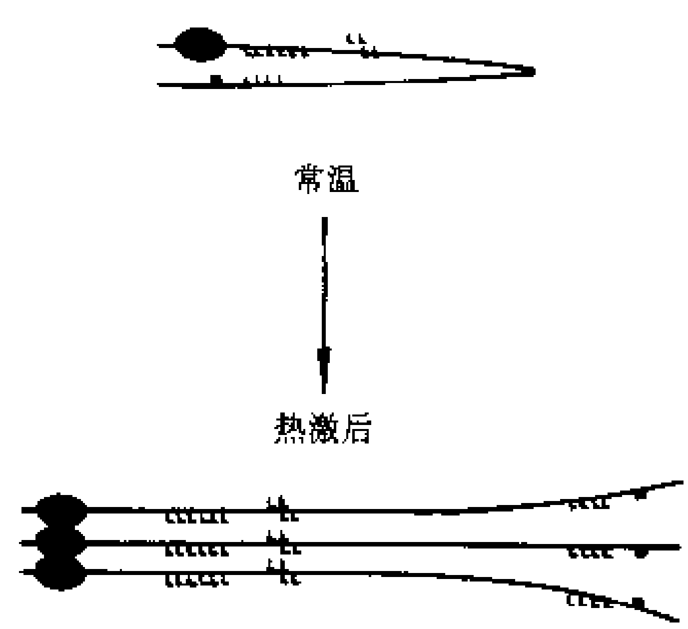



图5-3 HSF在常温和热激后的构像变化常温下HSF折叠的单体在热激后伸展并与其他单体形成三体输入核内，再与HSE特异结合，促进基因转录
（仿朱玉贤，1997）

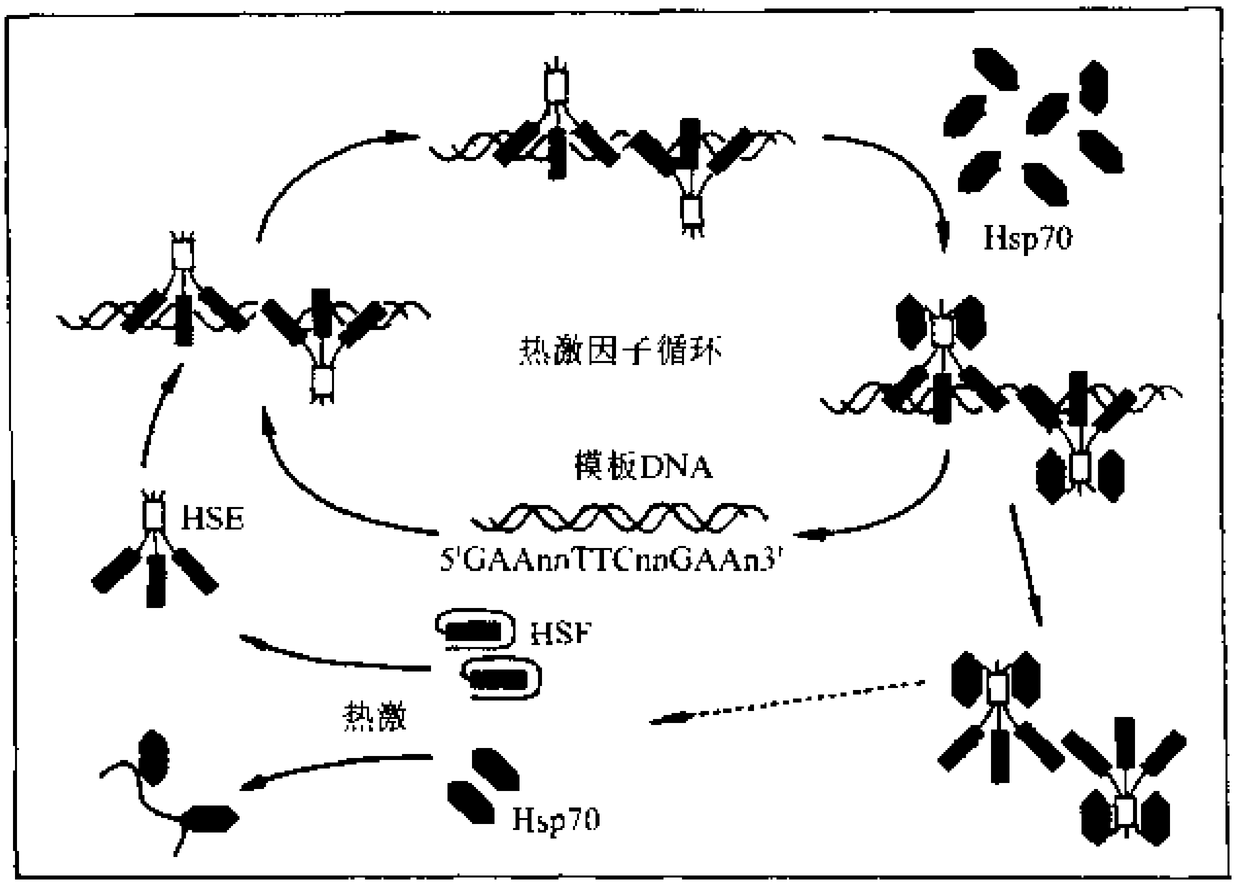



图 5-4 热激蛋白调控的基因表达机制
（仿朱玉贤等，1997）

## 4 基因的转录调节

如前所述，热激基因表达最初是在观察果蝇（*Drosophila busckii*）多线染色体膨突变化时发现的。Ritossa 发现，当果蝇短时间暴露于 31℃以上时，可诱导第 2 染色体左臂产生 3 个新的膨突。1970 年 Ashburner 也报道了黄猩猩果蝇中这种多线染色体上的热激效应，唾腺染色体上诱导产生的 9 个膨突，其中有 8 个（63C，64F，67B，70B，87A，87C，93D，95D）定位在第 3 染色体上，1 个（33B）定位在第 2 染色体上。考察时间和温度参数时发现，35～38℃时诱导膨突最有效时间<1min，加热 20～30min 时膨突最大，此后膨突逐渐萎缩。放线菌酮能抑制膨突萎缩，但不能诱导其产生，表明膨突的诱导不需要蛋白质的合成。

热激后染色体膨突的出现显然是诱导了新的转录，通过放射自显影发现〔$^3$H〕尿嘧啶插入了热激产生的膨突，但热激后插入原有膨突的量大大减少。RNA 多聚酶Ⅱ分布的变化也反应了从原有膨突到热激膨突转录的变化。

组织培养中的染色质也显示了这种热诱导变化。编码主要热激蛋白的 DNA 对 DNA 酶Ⅰ和小球菌核酸酶非常敏感，热激后非组蛋白的分布发生变化，能特异结合到调节 hsp70mRNA 表达的 DNA 区的蛋白质已得到分离。这些变化都与热激后转录的调节有直接的相关性。

另一个研究热激基因表达的方法是体外诱导法。据报道，热激的细胞质提取物能在体外诱导分离的唾腺染色体产生膨突，而对照实验则无此反应。进一步实验表明，细胞质中有 1 种膨突热稳定诱导物。Parker 等（1983）建立了能准确表达 hsp70 基因的体外系统。果蝇的酶提取物（包括 RNA 聚合酶Ⅱ）用于转录 DNA。这个系统可以用来研究热激基因

转录时蛋白质—DNA相互作用的详细过程。要确定在热激基因转录时起重要作用的基因序列，常用果蝇基因导入脊椎动物细胞，并在热激条件下证明其转录。这些研究表明，TATA区上游转录起始点5'端前60个碱基对hsp70基因表达非常重要。其中HSE与HSF结合，激发转录起始，当时果蝇细胞内HSP70的mRNA水平可提高1 000倍。

热激反应使大多数蛋白合成受到抑制。其主要作用是起始因子的磷酸化和去磷酸化的共价修饰、mRNA的拼接障碍，使降解加快，而正常基因转录受到抑制，其中RNA聚合酶Ⅱ最大亚基C端的磷酸化在转录中尤为重要。热激使去磷酸化减少，RNA聚合酶Ⅱ的活性减弱，改变非HSP、mRNA的核内运输，胞质中mRNA减少，从而影响蛋白质的合成。

## 5 转录调节的热激诱导

在较低温度下，热激蛋白是与组织特异性蛋白一起合成的。在39～40℃时蛋白质的合成完全关闭，在35～38℃的中间温度范围内热激蛋白选择性地被转录。热激mRNA的选择性转录并不是由于其他mRNA的损耗，这些mRNA仍存在于细胞中，并能在体外的网织红细胞胞溶产物中进行转录。有些证据显示，25℃的信使在长时间的36～37℃温育中多聚腺核苷酸序列有部分损失。1个无蛋白质合成的果蝇细胞中，热激细胞的胞溶产物仅转录热激蛋白，而25℃时细胞的胞溶产物同时转录热激和25℃的mRNA，这种作用不是热激mRNA竞争转录起始因子的结果。因为热激胞溶产物即使没有热激mRNA存在时，也不能转译25℃ mRNA。事实上25℃ mRNA转录能力与25℃细胞粗提核糖体有关。体外蛋白质合成系统也表明，热激mRNA肯定有某种特性使之能与25℃ mRNA相区别，所有热激mRNA都有1个特性，即含大约50%腺嘌呤长的5'端非转译区（编码区长度的50%），这一区域可能在体外通过修饰mRNA而选择性地转录。

考察热激影响蛋白质合成的另1个方法是给以40℃的短期热激，然后在25℃恢复蛋白质合成。已在果蝇的幼虫和蛹组织中进行了这方面的工作。在恢复期间，幼虫和蛹组织蛋白质合成都被抑制，在整个恢复过程中，即使25℃ mRNA存在正常量，开始都是选择转录热激mRNA，如果在加热到40℃以前，至35℃诱导热激基因表达，则细胞克服热激使25℃ mRNA转录的速度大大加快。这一结果表明，热激在恢复蛋白质合成过程中细胞代谢发挥着直接或间接的作用。

然而，热激mRNA选择性转录的机理仍有一些不明确的地方。一些资料表达了这样一种概念，即热激灭活了1种25℃ mRNA转录所必需的因子，而热激信使不需这种因子。这种因子至少在40℃时灭活，只有当这种因子重新合成时转录25℃ mRNA的能力才能恢复。这种失活因子可能是Sb一类核糖体蛋白，分子量$32\times10^3$u，热激后会使它很快发生脱磷作用。

Sehelling等（1996）为确定在热激处理前后粉纹夜蛾hsp70家族的转录丰度，用5'端部分序列作探针进行诺森（Northern）印迹分析。从37℃和42℃热激处理的幼虫以及非热激处理的幼虫中，均检测到了多聚腺核苷酸RNA的转录，在不同分子量的DNA梯度电泳中，与2kb大小的DNA片段的迁移率相同，从而估计其分子大小与所得到的cDNA克隆的分子相当。37℃和42℃热激处理使转录产物的丰度增加了2～3倍，这与其作为热激相关蛋白的身份是相符的。

从粉纹夜蛾幼虫5龄2d cDNA文库中分离出来的hsp82cDNA与黄猩猩果蝇的

hsp82cDNA具显著的同源性（图5-5）。当用克隆hsp82cDNA作37℃或42℃热激处理幼虫的多聚腺核苷酸RNA的探针时，检测到热激处理对大约2.6kb的转录产物有强烈的诱导效应，其丰富度增加100倍以上，同时保幼激素酯酶的转录量也有明显增加。

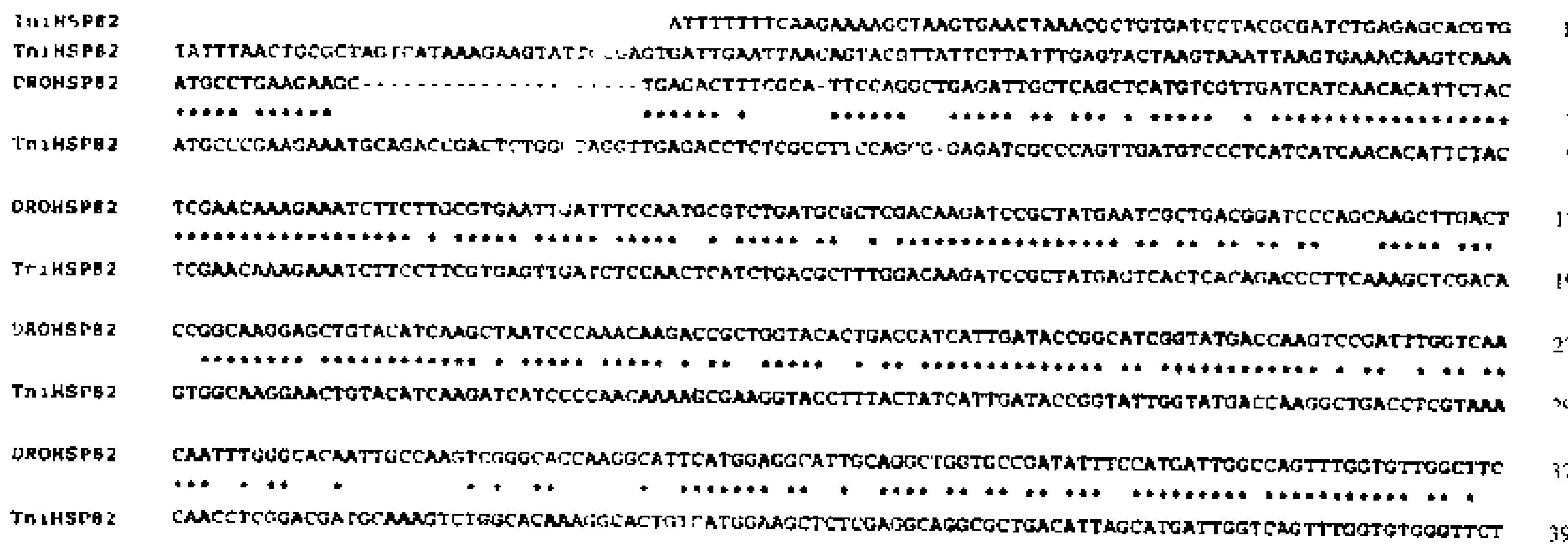


图5-5 粉纹夜蛾Tnihsp82和黄猩猩果蝇Drohsp82cDNA的核苷酸序列

（仿Schelling等，1994）

## 第四节 滞育与热激蛋白调控

热激蛋白与昆虫滞育期耐寒能力有很大关系。黄猩猩果蝇（Burton等，1988）和拟麻蝇（*Sarcophaga crassipalpis*）（Joplin等1990）的非滞育个体对寒冷反应时能产生热激蛋白以对付低温。舞毒蛾（*Lymafria dispar*）滞育的预成虫（Yocum等，1991）和麻蝇滞育蛹（Joplin等，1992）能在寒冷刺激下合成高分子热激蛋白，克服冷休克。Goto等（1998）报告，果蝇（*D.triauravia*）滞育成虫从冷休克中得到恢复时，积累了hsp70mRNA，进一步增强了越冬期间的耐寒能力。Yocum等（1998）报道，1个基因编码的热激蛋白，在麻蝇蛹滞育期有很大的调控作用。

### 1 滞育有关的热激蛋白

据Yocum等在拟麻蝇滞育蛹中分离到1种麻蝇蛹滞育蛋白pScD14，后来发现与黄猩猩果蝇23和26×$10^3$u小分子热激蛋白有很大的同一性（Sonthgate等1983），经过比较确认pScD14就是23×$10^3$u小热激蛋白，出现于麻蝇蛹滞育期，它随着滞育的启动开始合成，此后不受高温或低温胁迫的影响。但在非滞育期间，将蛹用－10℃或43℃处理2h后，即能诱导它的合成。因此，证明23×$10^3$u小热激蛋白是1种随伴滞育蛹产生抗寒能力的小分子物质，随着量的增多，抗寒能力也逐步提高。麻蝇体内合成23×$10^3$u蛋白并不需要环境条件的触发（Denlinger1991）。这种小分子热激蛋白在黄猩猩果蝇的蛹内，还表现出与耐高温能力的增加有关（Berger等1983）。另外黄猩猩果蝇S3细胞群用20-羟基蜕皮酮处理3d，也能表达出这种小热激蛋白，使麻蝇耐热能力相应增加（Treland等1982）。

小热激蛋白在滞育中还有另一个作用。它能调节细胞生长和分化周期。在麻蝇的滞育蛹G0/G1脑细胞中热激蛋白明显增多（Tammariello等，1998）。果蝇小热激蛋白的表达

与细胞周期的阻滞是协同进行的。麻蝇在滞育期，DNA 的复制作用下降，因此，细胞分裂受到抑制。

## 2 23kDa 热激蛋白的结构

从麻蝇滞育蛹文库中分离到 pScD14，通过 Northern 印迹杂交技术（Flannagan 等 1998）证实与果蝇 23kDa 热激蛋白相同，含有 823bp 插入，615bp 开放阅读框架，开始于甲硫氨酸密码子，编码为 205 氨基酸的蛋白，pI 为 5.99，分子量 $229.3\times10^3$u，由 SWISS—PRQT 的"compute pI/Mw"程序认定 pScD14 是一个 23kDa 的麻蝇小热激蛋白（Joplin 等 1990）。以 pScD14 编码的蛋白与鸡（*Gallus gallus*）的 alpha-β 晶体蛋白很相似。pScD14 氨基酸从 83～164 位与 *Ggallus* 的 71～152 位相同率达 68%。pScD14 作为 1 个小热激蛋白，因此又称为麻蝇热激蛋白 ScHSP23，具有应激低温和高温的特性，又与滞育相伴，在滞育蛹中具有和耐寒能力平行发生的关系。

ScHSP23 的核苷酸序列已经得到测定，并已存入基因库，编号 u96099，Yocum，还将其氨基酸序列和果蝇的 HSP22、23、26、27 进行了比较（图 5-1）。

# 第六章 昆虫的神经肽

昆虫神经肽是由神经分泌细胞产生的一类小分子化合物，一般由几个至十几个氨基酸组成，分子量最大的昆虫神经激素PTTH，单体含109个氨基酸。昆虫神经肽影响昆虫的生长、发育、变态、生殖和代谢等许多生理过程。为了加深了解神经肽的结构、生物合成和功能及基因表达的调节，20世纪70年代中期，许多昆虫学家便开始致力于分离和纯化这些神经肽。直肠肽(proctolin)是第一个从昆虫中分离出来的神经肽。分离者Starratt和Brown（1975）为了得到足够的纯肽用于分析，收集了125kg美洲大蠊，从中纯化到180μg纯肽，工作量十分巨大。这之后不久，英国科学家Stone（1976）等便在《Nature》上发表了他们对飞蝗激脂激素（AKH Ⅰ）的研究结果，这是一个广泛存在于飞蝗和沙蝗咽侧体中的神经激素，也是昆虫中发现的第一个神经激素。

20世纪80年代中期，多肽分离技术和结构鉴定技术取得重大进展。反相高效液相色谱应用于神经肽分析和快中子轰击质谱的应用不仅克服了昆虫个体小、神经肽含量低的困难，而且可检测肽类的翻译后修饰。气相测序仪的应用使肽类的一级结构测序灵敏了1 000倍。随着这些技术的应用，使鉴定的昆虫神经肽数目激增。1984年之前仅鉴定出4个，1989年为27个，1990年则达40多个，现在已达到100个以上。

此外，由于哺乳动物神经肽种类多、数量大，利用它制作抗体，通过免疫交叉反应而探测昆虫体内神经肽已经作为一种普遍的方法加以应用。如Proux（1987）等应用哺乳动物精氨酸加压素抗体分离到昆虫利尿激素便是成功的例子之一。

昆虫神经肽的生物学过程涉及形成、释放、与受体结合、引发生理效应、酶降解失活等过程，而且每一过程又含诸多步骤。

因而要全面了解某一神经肽的生理过程，均需要付出大量的劳动。对任何一类神经肽的综述，常常涉及几十篇至上百篇文献，这充分表明了神经肽发现过程的复杂性。

一般而言，神经肽仅是某基因产物的一小部分，其生物合成依赖于对前体蛋白质的酶剪接。如家蚕素（bombyxin）是从家蚕头部分离的功能未知的神经肽，由A链和B链构成。在生物合成中先由基因转录，再翻译出前家蚕素原（preprobombyxin），结构为信号肽/B链/2个碱性氨基酸残基/C肽/2个碱性氨基酸残基/A链；接着，切除信号肽，形成链内和链间的3个二硫键；最后切除C肽，即成为成熟的家蚕素分子。

有的昆虫，同一基因产物中包含有几个不同生理功能的神经肽。如编码家蚕滞育激素（DH）的基因，可读框编码192个氨基酸，从Met-1到Cys-23是一个疏水序列，为真核生物的信号肽；从Thr-24到Leu-47为家蚕滞育激素DH，Gly-48、Lys-49和Arg-50是DH翻译后加工时胰蛋白酶的酶切位点，加工时从Lys-49剪开，并用Gly-48的氨基将Leu-47酰胺化，从而形成DH的酰胺化C-端。Bom-PBANⅠ位于126～158位，全长33个氨基酸，Bom-PBANⅡ则为125～158位，全长34个氨基酸。在此可读框内，还有3段同样具有FXPKL保守序列的肽类：①从97～103位，是含有7个氨基酸的肽α-SGNP；②从106～122位全长17个氨基酸的β-SGNP；③从161～168位是含有8个氨基酸的γ-SGNP。此外，在DH和α-SGNP之间和γ-SGNP之后，还分别有全长44个和22个氨基酸残基的肽，其生理功能至今未见报道。可见，除了未知功能的几个肽外，这一基因至少编码诱导家蚕卵滞育的DH和促家蚕雌蛾性信息素生物合成的神经肽PBAN。但也有的神经肽由整个基因转录。如脱壳激素（EH）基因，其编码的氨基酸链除了前面一小段信号肽外，整个可读框的其余翻译产物便为脱壳激素。

神经肽可作为递质局部地分泌，或者作为激素释放到血淋巴，其释放时间一般受控于脑或其他激素。释放的刺激信号因神经肽的种类不同而异。可以是电脉冲、第二信使或其他信号。鳞翅目昆虫中脱壳激素（EH）释放到血淋巴，EH在VM细胞中合成，VM细胞轴突沿着中枢神经系统同侧向后延伸，直达腹末神经节。从腹末神经节伸出后终止于直肠神经，并在终止处形成大量膨大结构，这些结构可能与EH的释放有关。在脑内，VM细胞轴突具有位于同侧的两个细小分枝。在昆虫变态时，VM细胞形成一个新的脑内分枝。这一对分枝延伸至同侧的心侧体神经（NCC1+2）并内延到心侧体，甚至有少量神经纤维穿过心侧体而到达侧侧体，另一些则穿过心侧体后与逆走神经汇合。VM细胞在变态时形成的这一新的脑内分枝在预成虫时更为发达。故EH的释放位点随虫态而异。在幼虫和预蛹蜕皮时，EH通过中枢神经系统释放到血淋巴中，而在预成虫阶段蜕皮时，EH则通过心侧体释放。Adams和O' shea提出，在蜚蠊Ds运动神经元中可能是由于神经末梢内钙离子浓度因电位变化而增高，继而触发神经递质直肠肽的释放。沙漠蝗心侧体释放AKH，则可能是由神经递质章鱼胺触发。

神经肽与受体的结合是一个十分复杂的生理生化过程，至今为止，有结论的研究还不多。如1992年Puiroux等对飞蝗后肠膜上直肠肽的结合位点进行了鉴定。他们发现直肠肽可与膜上受体特异性结合。结合与时间有关，与膜蛋白浓度成正比，并具有饱和性和可逆性，其解离常数为96nm，最大结合量为3.37pmol/mg膜蛋白。对神经肽受体的分离、鉴定及肽与受体之间结合的具体过程仍有待深入研究。

在神经肽与受体结合后，产生特有的生理效应，在激发靶标的过程中，已经肯定磷酸肌醇、cGMP、cAMP 等第二信使发挥着重要作用。烟草天蛾 PTTH 与受体结合后，可能是先促使钙内流，钙又激活腺苷酸环化酶，提高细胞内 cAMP 水平，继而活化依赖于 ATP 的蛋白激酶，启动蜕皮酮合成过程。EH 与受体结合后，引起 cGMP 的提高。其刺激机理在不同的昆虫中途径不同。Marton 等（1992）对烟草天蛾腹神经索的研究结果表明，EH 通过刺激细胞内花生四烯酸的释放和代谢而提高细胞内 cGMP 的水平。Shibanaka 等（1993，1994）对家蚕的研究结果却表明，EH 刺激靶标细胞内的肌醇三磷酸，引起钙离子库释放大量的钙离子，后者激活氧化氮合酶产生大量氧化氮，再由氧化氮激活鸟苷酸环化酶合成 cGMP。在烟草天蛾中，腹神经索细胞内具有两种 $54u\times10^3$ 的蛋白质，称为脱壳激素环鸟苷酸调控磷蛋白（EGPs）。cGMP 的提高激活了 EGPs 磷酸化。而两种蛋白质的磷酸化可能是 EH 作用于靶标细胞的最后一个环节，从而引发靶标细胞的生理效应。

神经肽在执行功能后需要及时与受体分离，被酶降解失活，以避免这些神经肽对随后的正常生理功能的干扰。

在沙漠蝗神经细胞表面具有丰富的氨肽酶，可使直肠素降解为 Arg-Tyr、Tyr-Leu-Pro-Thr 等短肽和游离 Tyr，从而使直肠肽失活。AKH 是脂肪激活神经肽。作用于靶标组织的 AKH，由结合在膜上的内肽酶失活。该类内肽酶在沙漠蝗中存在于脂肪体、马氏管和骨骼肌组织的表面，可将 AKHⅠ或 AKHⅡ从 Asn-Phe 间切断，产生无活性肽段，再由氨肽酶从肽段 C 端逐一切下成游离氨基酸。

Werich 等（1995）加入氚标记的止亮氨酸合成了 Hez-PBAN（[$^3$H] NLPBAN），将其加入烟草天蛾和美洲棉铃虫的血淋巴中离体温育，形成了几种氚标记的降解产物。当 [$^3$H] NLPBAN 浓度为 0.9mM 时降解速率为 2～10fmol/min/ml 血淋巴。[$^3$H] NLPBAN 在烟草天蛾血淋巴中的初级降解反应不被 20mmol/L 亮抑酶肽、0.1mmol/L 氨肽酶抑制剂、1mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）、1mmol/L 乙二醇（2-氨基乙醚）四乙酸（EGTA）、1mmol/L 的 1，10-菲咯啉或 2mmol/L 的 4-（2-氨乙基）氟化磺酰基苯所抑制。但上述抑制剂可抑制次级反应。以上结果表明烟草天蛾和美洲棉铃虫血淋巴中含有使 PBAN 降解的肽酶，PBAN 可能由这些酶所分解。

近年来昆虫神经肽的大量发现引起了对这些肽类命名的混乱。不同的学者采用了不同的命名体系，因此即使对于同一神经肽，不同学者也经常给予不同的名字。为了改变这种命名的混乱状况。Raina 和 Gade（1989）提出并经改进形成了一套命名体系，其命名原则根据：①最先发现神经肽的昆虫的属名和种名的缩写；②最先描述的这种神经肽的生物活性；③若从同一种昆虫中发现了一系列同系物，则根据发现时间的先后缀以罗马数字。本章在介绍这些神经肽时将尽量采用这种命名方法，对于有些神经肽，原先的命名已普遍使用，则保留原名，而将 Raina-Gade 命名放于括号内。

## 第一节 促前胸腺激素

促甾类合成激素（steroidogenic hormone）是指刺激靶器官合成甾类激素的神经肽。

在幼虫期和蛹期，促留类合成激素的刺激器官为前胸腺，因而被称为促前胸腺激素（prothoracicotropic hormone，PTTH）。在成虫期时，促留类合成激素刺激卵巢，故常称之为卵发育神经激素（EDNH）。

对PTTH的研究最早可追述到Williams（1967），他以大型蛾类柞蚕为试虫，采用酶解和分光光度分析法，得到了一些初步结果。随后，Gibbs等（1977）以舞毒蛾幼虫为试虫，进行生测，结果表明，PTTH具有热稳定性，溶于水，可被链霉蛋白酶分解。但由于当时受到分析技术和纯化手段的限制，进展十分缓慢。直到10年之后，才由Nagasawa等（1986）分离出$4\times10^3$u-PTTH。至20世纪90年代，才鉴定出$22\times10^3$u-PTTH。

## 1 化学组成

家蚕的头中存在两种类型的PTTH，高分子量的$22\times10^3$u-PTTH（简称22K-PTTH）和低分子量的-PTTH（简称4K-PTTH），采用1个15步的分离纯化步骤，从65万个家蚕头中终于纯化到了低分子量PTTH。它由两条链组成，A链具有20个氨基酸残基，B链可由4种不同肽组成，两种具有26个氨基酸残基，另两种具有28个氨基酸残基。

A链　　H-GIVDECCLRPCSVDVLLSYC-OH

B链　　pQQPQAVHTYCARHLARTLADLCWEAGVD-OH

　　　　pQQPQGVHTYCARHLARTLADLCWEAGVD-OH

　　　　pQQAVHTYCARHLARTLADLCWEAGVD-OH

　　　　pQQGVHTYCARHLARTLADLCWEAGVD-OH

4K-PTTH与脊椎动物的胰岛素同源率非常高，后者也由A链和B链构成。A链的20个氨基酸中，相同位置的氨基酸有10个相同。若加上B链的氨基酸，同源率略有下降，但仍达40%。

研究表明，4K-PTTH又称为家蚕素，A链和B链之间以2个双硫键连接，同时，A链内部也形成1个分子内双硫键。分子生物学的研究表明，4K-PTTH在生物合成中先由基因转录，再翻译出前家蚕素原（preprobombyxin），结构为信号肽/B链/2个碱性氨基酸残基/C肽/2个碱性氨基酸残基/A链；接着，切除信号肽，形成链内和链间的3个二硫键；最后切除C肽，即成为成熟的家蚕素分子（图6-1）。

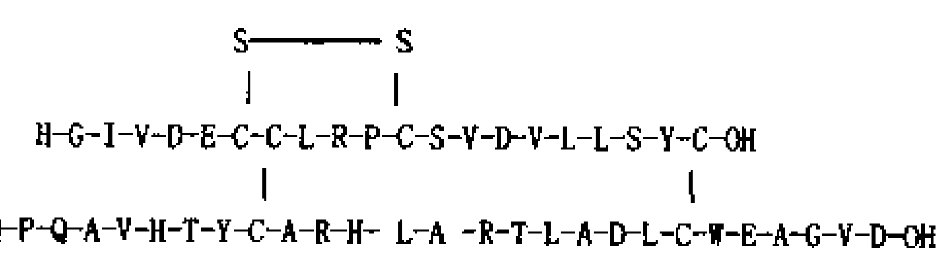



图6-1 4k-PTTH A链与B链的连接

多年来，对家蚕等22K-PTTH的纯化鉴定投入很大力量，但由于22K-PTTH在脑中含量极微，以及蛋白质化学所固有的技术性困难，工作进展较慢，在大量纯化的基础上，鉴定出家蚕的1个二聚体，分子量约为$30\times10^3$u。近年来克隆和鉴定了22K-PTTH的cDNA，才得以推导出大分子量的PTTH的全部氨基酸序列。并弄清了22K-PTTH首先合

成为 1 个 224 氨基酸的多肽前体（图 6-2），此多肽从 5' 端开始，依次是疏水性的信号肽(29 个氨基酸)，3 个疏水性氨基酸酶切位点 KRK，$2\times10^3$u 肽（p2K，21 个氨基酸），2 个疏水性氨基酸酶切位点 KR，$6\times10^3$u 肽（p6K，57 个氨基酸），3 个疏水性氨基酸酶切位点 RKR，位于 C 末端的 109 氨基酸是 22K-PTTH 亚基。因而 22K-PTTH 前体包含 4 个肽，除疏水性信号肽外，其他 3 个肽可能均具有生物活性。每个 22K-PTTH 亚基含有 7 个 Cys 残基，均参与二硫键的形成，且均是活性表达所必需的。天然的大分子量的 PTTH 分子由 1 个亚基间二硫链连接的两个相同亚基组成，每个亚基内由 3 个二硫键形成特定的活性空间构型（图 6-3）。

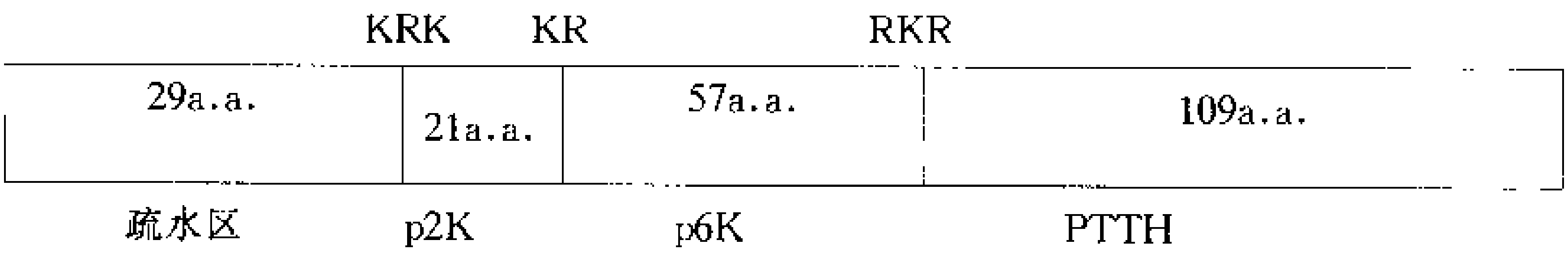



图 6-2　含有 224 个氨基酸的 PTTH 前体

KRK、KR、RKR 为酶切位点　aa 为氨基酸　p2K 与 p6K 分别为 2K 肽和 6K 肽

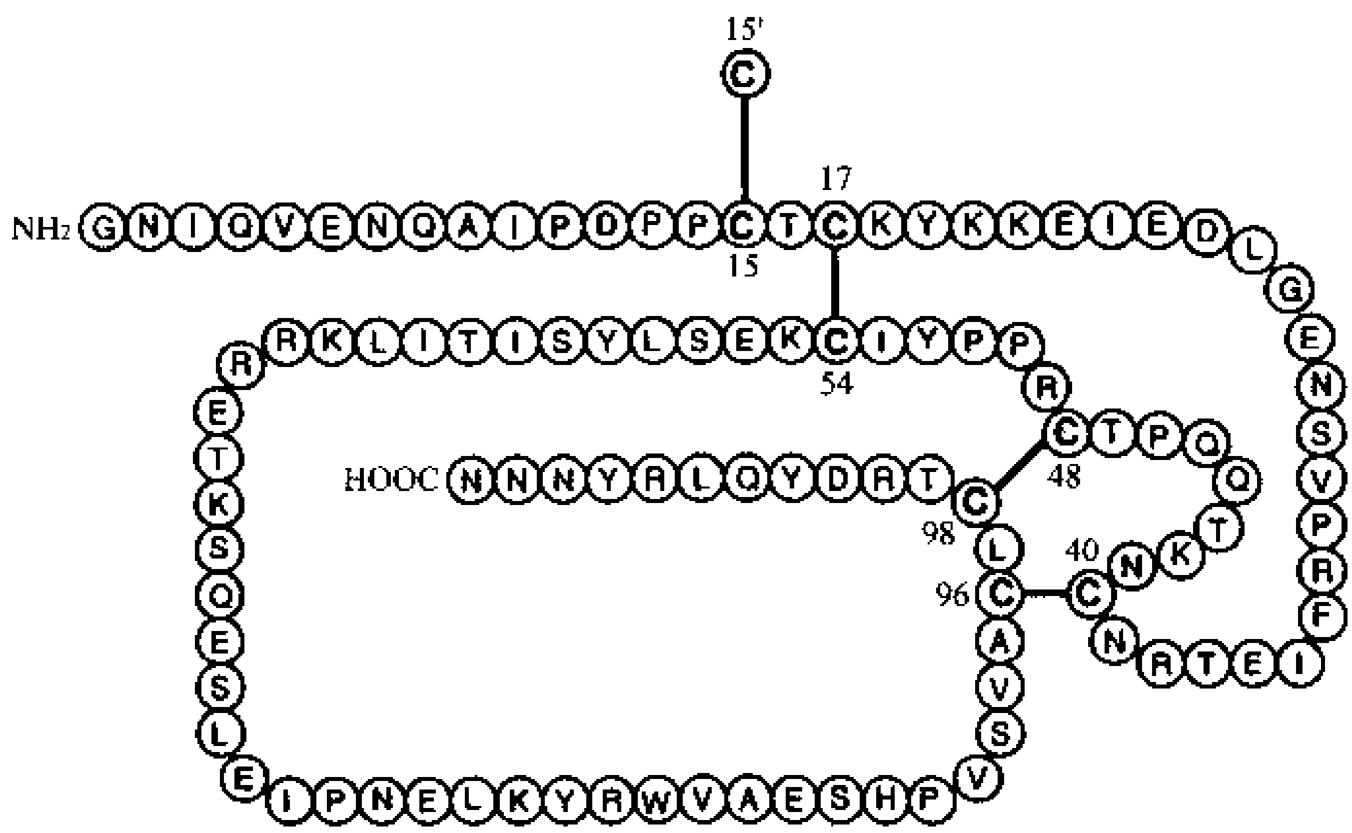



图 6-3　PTTH 的一级结构

不同昆虫 PTTH 具有多样性。烟草天蛾的 PTTH 为 $25.5\times10^3$u，也是由两个相同的 $16.5\times10^3$u 亚基组成的二聚体。但氨基酸组成不同于家蚕的 PTTH，而与视黄醇结合蛋白有较大的同源性。并且，烟草天蛾脑部分泌小分子量（$7\times10^3$u）和大分子量（$25.5\times10^3$u）的两种 PTTH。烟草天蛾 PTTH 的纯化和 cDNA 克隆也已有一定进展（Muehleisen et al，1990）。其序列中某一片段与脊椎动物细胞视黄醇结合蛋白有 70% 的相同性(Muehleisen et al，1993)。

## 2　分泌部位

曾有各种形态学和显微手术的研究，试图鉴定合成 PTTH 的脑神经分泌细胞

(Gilbert et al, 1980)，但均未得到确定的结果。值到 Agui 等（1979）和 Bollenbacher 等（1980）使用体外的 PTTH 测定法对烟草天蛾进行研究，才解决了这个问题。其基本方法是以剂量反应作为标准，定量测定蛹脑不同区域的神经分泌细胞群以及单个神经分泌细胞的 PTTH 活性，以确定特定细胞中 PTTH 活性。用这种方法，鉴定出烟草天蛾由背侧部前脑外侧区的成对肽类神经分泌细胞群Ⅲ（L-NSC-Ⅲ）分泌并依赖于滞育变化（Hartfelder et al.，1994）。

近年来，由于分子生物学技术的发展，对分泌细胞的定位已较为简单，在弄清了家蚕 PTTH 分子结构的基础上，用原位杂交的方法证明了 PTTH 的前体 mRNA 位于家蚕脑的背侧部两对神经分泌细胞（Kawakami et al，1990）中。合成的 PTTH 前体沿细胞轴突经脑中沟到对侧的心侧体和咽侧体，再释放到血淋巴。

## 3　释放的控制

已弄清楚 PTTH 释放机制的只限于很少几种昆虫。最清楚的实例为吸血蝽。当它腹部伸胀的感受器向脑发出神经信号时，引起 PTTH 的释放。因此，这种机制保证了幼虫只有在获得满足自己的生长和形成新表皮所需要的营养物后才释放 PTTH。然而就是在这种情况下，从肠道开始伸胀到积累足够发动蜕皮的 PTTH 之间，还需要很多时间，因此还是没有弄清所有步骤。

在烟草天蛾幼虫中，PTTH 的释放受一个时辰钟的控制。家蚕这个时辰钟把释放的可能时间限制在每天的某段时间。幼虫蜕皮时，释放 PTTH 的“大门”正好在天黑前打开，并一直开放大约 10h。对于一个特定的幼虫，在这个“大门”的开放期，当达到或超过某一特定体重时就释放 PTTH。与幼虫蜕皮不同，烟草天蛾引起变态作用的 PTTH 的释放受多种因素控制。家蚕与其他昆虫的蜕皮相同，即只有当幼虫在 1d 之中的一定时期达到了某一特定的体重之后才释放 PTTH。但高水平的 JH 可阻止 PTTH 的释放。当 JH 的滴度降低后才释放 PTTH。蜚蠊的末龄若虫，在给予 JH 后，也发生延迟释放蜕皮素的现象（大概 PTTH 的释放也如此）。在某些昆虫中，在某一特殊的生活时期 PTTH 的分泌被阻断。这时就出现发育的中止状态（滞育）。这种状态常使昆虫渡过恶劣的气候条件。随后脑又被环境因素（诸如光周期或温度）重新激活，从而终止滞育。

## 4　活性

前原 PTTH 在轴突运输过程中，经蛋白水解酶降解释放出功能性 22K-PTTH 亚基。两个亚基由双硫键连接并糖基化，形成 1 个同型二聚体的成熟大分子量的 PTTH 分子，与另两个水解产物 p2K 和 p6K 一起，释放至血淋巴中。前者运输至前胸腺，作用于前胸腺 PTTH 受体，而后两者可能调节咽侧体的活性，与合成保幼激素有关。

烟草天蛾脑部分泌小分子量（$7\times10^3$u）和大分子量（$25.5\times10^3$u）的两种 PTTH。它们都是从相应的神经血器官（心侧体）释放到血淋巴，且前者释放早于后者，释放量随龄期而变化。大分子量的 PTTH 在刺激幼虫和蛹的前胸腺活性上具有同等效力，而小分子量的 PTTH 对幼虫前胸腺的刺激能力大于对蛹的刺激能力。家蚕脑内同样含有两种具有促前胸腺活性的神经肽。一种是大的 $44\times10^3$u 的 PTTH，仅能活化自身幼虫

和蛹期的前胸腺；另一种是小的 $4\times10^3$u 的家蚕素（bombyxin），在生理浓度范围内不能刺激家蚕前胸腺合成并分泌蜕皮激素。和烟草天蛾对比，家蚕的促前胸腺活性分子有发育阶段的专一性，大分子量的 PTTH 能同等程度地刺激幼虫和蛹前胸腺合成、并分泌蜕皮激素，小分子量的 PTTH 偏向于刺激幼虫前胸腺，但对蜕皮作用不大。与此相似的是，多种昆虫中小分子量的 PTTH 作用谱均较广，种的专一性比较低。如甘蓝夜蛾的小分子量的PTTH能刺激家蚕前胸腺，金凤蝶小分子量的 PTTH 能活化甘蓝夜蛾和家蚕的前胸腺。

## 5 作用方式

PTTH 的靶器官是前胸腺和某些昆虫的卵巢。其作用模式属第二信息系统。前胸腺激活作用的第一步出现的是 cAMP 的增加。Vedeckis 和 Gilbert 指出在氨茶碱（抑制降解 cAMP 的磷酸二酯酶）存在下，用 cAMP 或是单独用氨茶碱或 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤刺激离体的烟草天蛾前胸腺时，引起 α-蜕皮素的产生和分泌。而且，在释放 PTTH 来发动变态作用的时候，可在腺体内看到 1 个 cAMP 的活性峰。

随后的研究表明，PTTH 作用于前胸腺（PG）时，首先与膜上受体结合，开启钙离子通道，使细胞内钙离子增加，接着激活在钙离子和 G 蛋白参与下的腺苷酸环化酶活性，促使 PG 细胞内 cAMP 的合成，导致依赖于 cAMP 的蛋白激酶活化。蛋白激酶使核糖体蛋白 $S_6$，其他特殊蛋白质如 β-微管蛋白等磷酸化。这些磷酸化的蛋白质参与调节蛋白质合成，促进一些调节蜕皮甾醇合成的蛋白质和酶的合成，最终导致蜕皮激素的合成和分泌。

在昆虫中，蛋白质和可能的 RNA 合成都是 PTTH 产生蜕皮甾醇所必需的。昆虫蜕皮激素的合成途径不同于脊椎动物甾醇类激素，因而 PTTH 促进的蛋白质合成也不同于脊椎动物。在烟草天蛾 PG 中，有 3 种蛋白质的合成与 PTTH 激活 PG 有密切关系：第 1 种是分子量 $70\times10^3$u 的热激蛋白（heat shock protein）；第 2 种是分子量 $52\times10^3$u 的 β-微管蛋白；第 3 种是分子量 $100\times10^3$u 的非细胞骨架或整合蛋白。这些特殊蛋白质的合成与启动 PG 内蜕皮激素的合成有着密切的关系。PTTH 也可刺激烟草天蛾 PG 内一般性蛋白质的合成，但激活这些蛋白质的合成途径与 PTTH 激活 PG 合成蜕皮素所需的蛋白质不同。

## 6 抗 PTTH 作用的激素

近年来研究发现，在昆虫体内还存在与 PTTH 作用相颉颃的神经肽。华跃进等报道，在红头丽蝇（*C. vicina*）中分离到一种含 NPTNLH6 个氨基酸的六肽，是一种蜕皮静止素（ecdysiostatin），又称抑前胸腺激素（prothoracicostatic hormone，PTSH）（Hua and Koolman，1995）。与此类似的蜕皮酮合成抑制因子最早是由 Carlisle 和 Ellis 于 1994 年在蝗虫体内发现的，不久 Bylmans 等（1994）在麻蝇（*Sarcophaga*）中也分离到一种类似的肽，命名为胰蛋白酶调节的卵抑制因子（trypsin modulating oostatic factor，TMOF），它抑制消化道中类胰蛋白酶（trypsin-like enzymes）的生物合成，使昆虫血淋巴中游离氨基酸减少，而阻断卵的发育。经研究证实，TMOF 与蜕皮静止素结构相同，它既抑制丽蝇环

腺中蜕皮酮的合成，也存在于雌成虫的卵巢中。

在烟草天蚕幼虫和蛹内，蜕皮甾醇激活肽的作用是通过胞内 cAMP 浓度升高，从而激活大 PTTH 的合成（Smith，1993）。cAMP 在鳞翅目昆虫中是作为蜕皮甾醇合成的第二信使存在的，它能刺激蜕皮甾醇的生物合成。但在双翅目昆虫体内，蜕皮甾醇的合成不以 cAMP 为第二信使，而是依赖于钙离子。华跃进的研究发现，六肽提高胞内 cAMP 的水平，而抑制蜕皮甾醇的合成。显然双翅目与鳞翅目的抑制调控机制不同。

与抑前胸腺激素六肽结构相同的折翅蠊六肽 Neb-TMOF 具有多效性。它在雌成虫中肠中抑制类胰蛋白酶的合成；在前胸腺中又抑制蜕皮甾醇的合成，两者之间有什么联系，至今还不清楚。当向雌蝇体内注射 20-羟基蜕皮酮时，并不影响类胰蛋白酶的生物合成。由此看来，Neb-TMOF 在成虫消化道与幼虫环腺中靶组织不同，存在明显的专化性。

Neb-TMOF 抑制蜕皮甾醇合成的活性与肽链长度和氨基酸序列有关。当第 3 位上苏氨酸（T）缺失时，活性明显下降，若第 1 位上天冬酰胺（N）被天冬氨酸（D）所取代，活性减低 90%以上。若第 6 位上组氨酸（H）变成精氨酸（R），则活性完全丧失。华跃进认为，在不同靶标上有不同性质的六肽受体。六肽结构的改变，使受体的敏感性发生了变化。另外，六肽在抑制卵巢发育和蜕皮酮合成方面，还存在很大的种间特异性。Neb-TMOF 对丽蝇和麻蝇幼虫有明显的抑制蜕皮甾醇的活性，但对果蝇则没有这种活性。

在昆虫体内观察到几种蜕皮甾醇抑制激素类似物。红头丽蝇中测到 1 种 $>10\times10^3$u 的因子，它是 TMOF 六肽的前体还是代谢物尚不清楚。用免疫组织化学试验，发现在丽蝇成虫卵巢内，有 Neb-TMOF 抗体使着色的复合蛋白，分子量达到 $75\times10^3$u，可能是 TMOF 的前体（Deloof et al.，1995）。

六肽在幼虫体内的生理作用还未搞清。在蝇蛆中，TMOF 位于脑复合体中。它是 1 种脑肽，但它又存在于卵巢中。因此，说它具有双重定位特性。六肽可能作为激素起作用，也可能是一种神经递质，从它的抑制蜕皮甾醇合成的高效应来看，它是名符其实的 PTTH 颉颃剂。搞清它的作用机理，是值得今后研究的重要课题。

## 第二节 抑咽侧体神经肽与促咽侧体神经肽

近年来，人们对控制 JH 合成的机理研究很感兴趣。国外的研究者利用反相高效液相色谱快中子轰击质谱等色谱新技术证明 JH 的合成受两类昆虫神经肽激素控制，即抑咽侧体神经肽（Alltostatin，AS）和促咽侧体神经肽（Allatotropin，AT），这是 1 对相互颉颃的激素。前者抑制 JH 的合成，使咽侧体（CA）处于静止状态；后者则刺激 JH 的合成，使咽侧体处于活化状态。

国内对这一族的神经肽已由关雪辰进行了研究。已发现七星瓢虫脑分泌 1 种 CA 的活化因子，观察到粘虫成虫 CA 分泌的 JH 对生殖的抑制作用是受脑神经分泌细胞分泌的 CA 静止因子控制的（Guan Xuechen et al，1994）（表 6-1）。

**表 6-1 促咽侧体神经肽（AT）和抑咽侧体神经肽（AS）的氨基酸序列**

| 神 经 肽 | 氨基酸序列 |
|---|---|
| *Manduca* AT（Mas-AT） | GFKNVEMMTARGF-$NH_2$ |
| *Manduca* AS（Mas-AS） | pQVRFRQCYFNPISCF-OH |
| *Diploptera* ASⅠ（Dip-AST1） | APSGAQRLYGFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera* ASⅡ（Dip-AST2） | GDGRLYAFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera* ASⅢ（Dip-AST3） | GGSLYSFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera* ASⅣ（Dip-AST4） | DRLYSFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera* ASⅤ（Dip-AST5） | AYSYVSEYKRLPVYNFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera* ASⅥ（Dip-AST6） | YPQEHRFSFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera* ASⅦ（Dip-AST7） | DGRMYSFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta* ASⅠ（Pea-AST1） | SPSGMQRLYGFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta* ASⅡ（Pea-AST2） | ADGRLYAFGL-$NH_2$ |

注：AST 原缩写为 AS。

## 1 化学结构

Kataoka 等（1989）第一次从烟草天蛾（*Manduca sexta*）成虫头部分离、纯化出 AT。它是由 13 个氨基酸构成的小肽，可强烈地促进离体 CA 的 JH 合成（Guan Xuechen et al, 1994)，称为 Mas-AT。不久他们又以同种昆虫鉴定出多种 AS（Kramer et al, 1991）。

AS 研究较多的是太平洋折翅蠊（*Diploptera punctata*）。早在 1980 年 Tobe 对影响 JH 合成的调节因子进行了研究，结果表明，AS 产生于脑神经分泌细胞，通过神经（或体液）传递到 CA，抑制 CA 的活性（Stay et al, 1992)。只在近几年，有几个试验室才先后从折翅蠊脑 CC-CA 中分离出 7 种 AS（Pratt et al, 1991; Woodhead et al, 1989 Dorn et al, 1993)。它们由 8～18 个氨基酸构成。其氨基酸序列有一定的相似性，C-末端的氨基酸已酰胺化（-Phe-Gly-Leu-$NH_2$），表明这些肽类属同一族。到 1994 年为止，先后已分离到折翅蠊 AS 已达 13 种之多。

此后不久，Weaver 及其同事从美洲大蠊中分离出两种 AS，称为 Pea-AS-Ⅰ和 Pea-AS-Ⅱ。Pea-AS-Ⅰ具有 13 个氨基酸，与 Dip-AS-Ⅰ具有相同的氨基酸数目，除 Dip-AS-Ⅰ的 1 位和 5 位丙氨酸分别被 Pea-AS-Ⅰ的 1 位和 5 位上丝氨酸和蛋氨酸取代外，其余氨基酸均相同，同源率高达 84.6%。Pea-AS-Ⅱ与 Dip-AS-Ⅱ均具有 10 个氨基酸，除 1 位上前者为丙氨酸后者为甘氨酸外，其余氨基酸均相同，同源率高达 90%。到 1994 年 Stay 等又分离到 8 种 AS，总计在美洲大蠊中先后分离到 13 种。此外，Dure 等（1994）在黑颊丽蝇（*Calliphora vomitoria*）中分离到 8 种 AS。Lorenz 等（1995）在二点蟋蟀中分离到 6 种 AS。Unnithan 等（1995）在蜜蜂（*Apis mellifera*）中分离到 3 种 AS。Gäde 等（1997）综述昆虫中 AS 已达 42 种之多。

## 2 结构与活性的关系

对 Mas-AT 的活性研究结果表明，从 N-末端切去氨基酸残基并不影响其活性。Mas-AT 4～13，5～13，6～13 的部分氨基酸残基的生物活性与 1～13 的全肽相当。但 7～13 的氨基酸残基活性只有全肽的 1/10。

在AS初级结构鉴定的基础上，Hayes等对AS族系中最小的1个肽AS-4的结构与活性进行了研究（Hayes et al，1994）。结果表明，太平洋折翅蠊AS负责抑制JH生物合成和释放的肽链片段位于C末端核心序列Tyr-Xaa-Phe-Gly-Leu-$NH_2$。

从表6-1中可以看出，烟草天蛾AS的非酰胺化C-端的氨基酸残基，完全不同于太平洋折翅蠊的7种AS。这是两种不同目昆虫AS缺乏交叉反应的分子结构基础。同样，烟草天蛾AS对美洲蜚蠊CA也不起作用。然而，这些肽对亲缘关系比较近的昆虫CA起作用。如太平洋折翅蠊AS能影响美洲大蠊和蟋蟀CA的活性。

Kataoka等的研究结果表明，Mas-AT虽然对烟草天蛾的初羽化雌成虫具有显著的促保幼激素合成活性，但对幼虫和蛹无效。Mas-AT对黄粉虫（*Tenebrio molitor*）、沙蝗*Schistocerca nitans*，和美洲大蠊（*P. americana*）的雌成虫无活性，而对烟芽夜蛾（*H. virescens*）雌成虫却有明显刺激活性。这表明Mas-AT只局限于刺激鳞翅目昆虫成虫CA，使之合成保幼激素。

## 3 分布、传递与生理功能

由折翅蠊和烟草天蛾脑鉴定出两种调控JH合成的AS和AT，表明脑是产生AS、AT的重要器官。Stay等用免疫细胞化学方法证明AS广泛分布于折翅蠊的神经系统，如脑、CC-CA复合体、触角搏动器官神经中（Stay et al，1994）。Yu等也应用酶联免疫法（ELISA）测定了交配折翅蠊雌虫脑、CA、血淋巴及中、后肠中的AS含量变化。观测到脑中AS量的变化和雌虫生殖周期变化密切相关。而在未交配的雌虫中没有这种变化。表明AS在此生殖期对JH合成起重要调节作用。卵黄发生期（羽化后4d雌虫）AS-1的含量最低，此时JH合成最高。体外生测CA和血淋巴中AS量的变化同样表明，卵黄发生期和怀卵期雌虫CA中的AS含量少，卵黄发生后立即增加。在交配雌虫血中AS-1免疫反应物质的量也随生殖周期而变化。卵黄发生期低，产卵时出现高峰（最大为2.25nm），以后下降。此外，使用AS-1单抗免疫化学反应，在触角神经中显示很强的免疫活性。经Sep-pak纯化的提取物连续两次HPLC可分离出5个具有AS活性的峰。这些研究进一步说明了AS广泛地分布于神经系统和一些组织中。

免疫化学研究证明，AS是通过侧神经分泌细胞传递到CA（Lange et al，1993；Stay et al，1992，1994）。而且AS也循环于血淋巴中。AS的分布表明，AS除了调节JH合成，可能还有许多其它功能。

## 4 影响AS释放的一些因子

许多因子如神经、JH类似物和卵巢等都可通过CA调控JH合成。连接脑与CA的神经、卵母细胞的发育和JH类似物的应用都可通过AS的释放影响CA活性。少量JH类似物局部施加虫体后可刺激JH合成，而高剂量则抑制JH合成，这已在折翅蠊和七星瓢虫中得到证明（Guan Xuechen，1987）。低剂量对JH合成产生刺激作用必须有卵巢存在，而高剂量不需要卵巢存在，但需要CA与脑之间的神经连接。这些实验表明，无论是卵巢还是CA与脑之间的神经连接，对JH合成的调节都是重要的。

卵巢和外源JH类似物对CA的作用与血淋巴中AS水平有关。在有完整神经连接的

折翅蠊中，CA活性强烈地受到JH类似物7S-hydroprene的抑制，切除神经的CA则抑制作用小。经7S-hydroprene处理切除CA神经的昆虫血淋巴中AS含量明显增加（>3nmol/L，正常<0.04nmol/L）（Stay et al，1994）。这些资料表明，在CA神经末梢AS可以正常释放，由于CA的神经切除，AS释放到血淋巴中则较少地抑制CA的JH合成。

当卵巢移植到7S-hydroprene切断CA神经的雄虫时，血淋巴中AS明显地减少。因此JH类似物对脑释放AS起作用，卵巢对抗这一作用。无论是JH类似物还是卵巢都需通过AS的释放影响JH合成。

## 5 分子生物学

Feyereisen实验室应用分子生物学方法研究了AS。他们认为通过1个AS基因族系的存在和/或单一转译产物上存在多种肽，可以解释在折翅蠊中AS肽系的多样性及AS广泛分布的原因。为此由折翅蠊雌虫脑克隆AS的前体cDNA。

Bendena及其合作者研究太平洋折翅蠊的cDNA，通过多聚酶链反应，得到一个编码370个氨基酸残基的前原激素的基因。对这一前体的分析表明，其中含有13个AS，除去已经鉴定出来的7个（在cDNA序列所编码的肽类中的排列顺序为7、9、8、5、2、11、4）AS外，还有6个AS存在。由cDNA序列推导的这6个AS结构列于表6-2中，后缀数字表明这些AS在cDNA序列所编码的肽类中的排列顺序。

Tobe等应用聚合酶连锁反应由美洲大蠊（*Periplaneta americana*）获得了cDNA。它编码14个AS（Ding et al，1993）。除已经分离鉴定出的2个（在cDNA序列所编码的肽类中的排列顺序为7、9）外，还有12个（表6-2）。

**表6-2 cDNA编码的类抑咽侧体神经肽的氨基酸序列**

| 神 经 肽 | 氨基酸序列 |
|---|---|
| *Diploptera punctata* 1（Dip-AST1） | LYDFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera punctata* 3（Dip-AST3） | SKMYGFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera punctata* 6（Dip-AST6） | ARPYSFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera punctata* 10（Dip-AST10） | PVNSGRSSGSRFNFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera punctata* 12（Dip-AST12） | PFNFGL-$NH_2$ |
| *Diploptera punctata* 13（Dip-AST13） | IPMYDFGI-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 1（Pea-AST1） | LYDFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 2（Pea-AST2） | AYSYVSEYKRLPVYNFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 3（Pea-AST3） | SKMYGFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 4（Pea-AST4） | SGNDGRLYSFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 5（Pea-AST5） | DRMYSFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 6（Pea-AST6） | ARPYSFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 8（Pea-AST8） | GGSMYSFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 10（Pea-AST10） | PVSSARQTGSRFNFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 11（Pea-AST11） | SPQGHRFSFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 12（Pea-AST12） | SLHYAFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 13（Pea-AST13） | PYNFGL-$NH_2$ |
| *Periplaneta americana* 14（Pea-AST14） | IPMYDFGI-$NH_2$ |

另外Tayler等由烟草天蛾蛹脑中分离出AT的基因，核苷酸序列分析表明AT是由一

个多蛋白前体衍生而来（Taylor et al，1993）。

## 6 在其他昆虫中的分布

黑颊丽蝇（*Calliphora vomitoria*）脑抽提物的部分纯化产物，可显著抑制太平洋折翅蠊咽侧体的合成活性（5个脑当量时抑制率为74%）。Dave等（1993）在纯化FMRF-$NH_2$肽类时，从此丽蝇胸部神经节中分离到1个C-末端与蜚蠊AS高度同源的16肽，命名为丽蝇抑制肽，（Callatostatin），采用callatostatin1抗体对高压液相色谱分离组分进行放射免疫分析，从黑颊丽蝇头、胸部神经节或整体抽提物中鉴定出了另外4个肽。除了Callatostatin 5外，其余4个肽C-末端残基为YXFGL-$NH_2$。由于Callatostatin 2和Callatostatin 3分别是Callatostatin 1的一部分，这2个肽是基因产物还是Callatostatin 1的切割产物仍需进一步验证。此外，这5个肽的氨基酸序列均不同于太平洋折翅蠊的AS（表6-3）。

**表6-3 黑颊丽蝇的丽蝇抑制肽类的一级结构**

| 神经肽 | 氨基酸序列 |
|---|---|
| *Calliphora vomitoria* 1（Cav-AST1） | DPLNEERRANRYGFGL-$NH_2$ |
| *Calliphora vomitoria* 2（Cav-AST2） | LNEERRANRYGFGL-$NH_2$ |
| *Calliphora vomitoria* 3（Cav-AST3） | ANRYGFGL-$NH_2$ |
| *Calliphora vomitoria* 4（Cav-AST4） | （D/N）RPYSFGL-$NH_2$ |
| *Calliphora vomitoria* 5（Cav-AST5） | GPPYDFGM-$NH_2$ |

这5个肽虽然能抑制太平洋折翅蠊咽侧体合成保幼激素，但却不能抑制黑颊丽蝇的JH合成。这表明丽蝇抑制肽虽然与AS高度同源，但不是黑颊丽蝇的抑咽侧体神经肽。

采用AS抗体，测定其他昆虫对抗体的免疫反应，结果表明黄猩猩果蝇（*D. melanogaster*）幼虫、蛹和成虫的脑内均具有大量免疫反应细胞。同样，在舞毒蛾成虫脑内、意大利蜜蜂（*Apis mellifera*）脑和咽下神经节中也有这类反应细胞。

# 第三节 利尿激素与抗利尿激素

利尿激素（diuretic hormone，DH）又称利尿肽（diuretic peptide，DP）和抗利尿激素（antidiuretic hormone，ADH），又称抗利尿肽（antidiuretic peptide，ADP），它们控制着昆虫水和离子的平衡及废物的移除，对维持昆虫稳定的内环境具有非常重要的意义。

最先证实存在利尿激素的昆虫是吸血蝽（Maddrell，1963，1964）。这种昆虫每1龄期都吸食1次相当于其身体体积10倍的血餐，接着便排泄大量尿液。这一排泄过程是由存在于新吸血的昆虫血淋巴中的利尿激素刺激的，而利尿激素在空腹的吸血蝽血淋巴中不存在。器官移置和抽提物注射试验证实，吸血蝽利尿激素存在于胸—腹神经愈合体中。随后的研究表明利尿激素在很多昆虫中存在，并且证实了利尿激素粗提物的种间活性。

## 1 利尿激素

### 1.1 化学结构

1987年Schooley等应用精氨酸加压素抗体从飞蝗（*Locusta migratoria*）咽下和胸部

神经节中分离出具有利尿作用的精氨酸加压素（arginine vasopressin，AVP）类似物，称为 Lom-DH。同时还分离出含量更为丰富的具有相同氨基酸但无活性的另一种类似物。Prou 等采用尺寸排阻层析技术鉴定出 Lom-DH 可能是无活性的单体 F1 组成的二聚体。异构体特异性化学分析结合酶解和测序分析结果表明，Lom-DH 是由 F1 组成的反向平行二聚体，而正向平行二聚体无利尿活性。

飞蝗利尿激素单体与低等脊椎动物的 AVP 具有 78%的同源率，与高等哺乳动物的 AVP 具有 67%的同源率（图 6-4）。

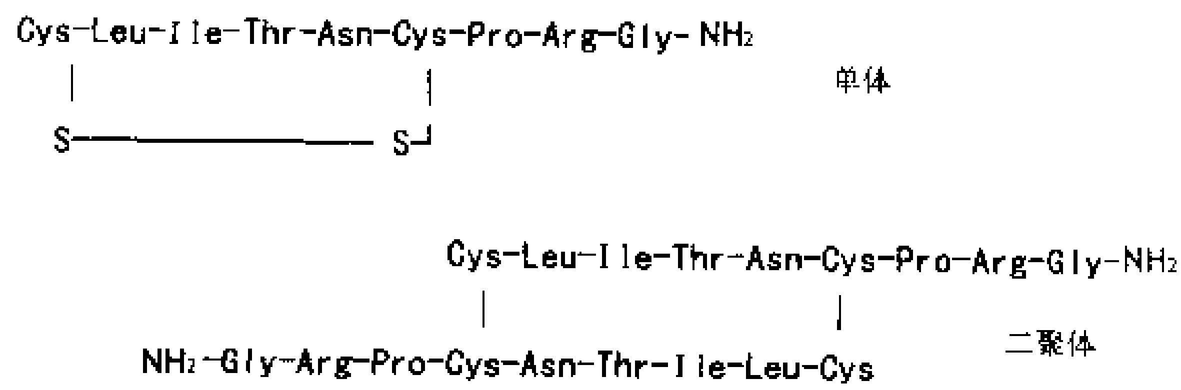



图 6-4 飞蝗利尿激素单体和反向平行二聚体

Kataoka 等（1989）从烟草天蛾（*Manduca sexta*）头中分离到 Mas-DH-Ⅰ，这是 1 个由 41 个氨基酸组成的 N-末端不封闭的肽，没有二硫键。Mas-DH-Ⅰ的氨基酸序列与促肾上腺皮质素释放因子硬骨鱼紧张肽Ⅰ（urotensin Ⅰ）高度同源，与蛙皮降压肽（sauvagine）也具有较高的同源性。Blackburn 等（1991）接着分离到 Mas-DH-Ⅱ，这是一个由 30 个氨基酸组成的 N-末端酰胺化的肽，也不具有二硫键。另外，Lehmberg 等（1991）和 Kay 等（1991）也分别从飞蝗和家蟋蟀（*Acheta domesticus*）中也分别鉴定出了 Lom-DH 和 Acd-DH 表 6-4。

表 6-4 利尿激素族肽类的一级结构

| 昆虫 | 利尿激素 | 结构 |
|---|---|---|
| 烟草天蛾 | Mas-DH-Ⅰ | RMPSLSIDLPMSVLRQKLSLEKERKVHALRAAANRNFLNDI-OH |
| 烟草天蛾 | Mas-DH-Ⅱ | SFSVNPAVDILQHRYMEKVAQNNRNFLNRV-$NH_2$ |
| 飞蝗 | Lom-DH-Ⅱ | MGMGPSLSIVNPMDVLRQRLLLEIARRRLRDAEEQIKANKDFLQQI-$NH_2$ |
| 家蟋蟀 | Acd-DH | TGAQSLIVAPLDVLRQRLMNELNRRRMRELQGSRIQQNRQLLTSI-$NH_2$ |
| 美洲大蠊 | Pea-DH | TGSGPSLSNNPLDVLRQRLLLELARRRMRQSQDQIQANREILQTI-$NH_2$ |
| 家蝇 | Mud-DH | NKPSLSIVNPLDVLRQRLLLELARRQMKENTRQVELNRAILKNV-$NH_2$ |
| 黄粉甲 | Tem-DH | SPTISITAPIDVLRKTWEQERARKQMVKNREFLNSLN-$NH_2$ |

## 1.2 功能

利尿激素的作用是加速尿液的更快分泌，对钾离子、钠离子的浓度无影响。当环境湿度增加时，飞蝗的两条 F1 链可在体内反向平行地形成两个链间二硫链，成为有活性的 Lom-DH。它通过增加 cAMP 而促进原尿形成，从而维持昆虫内环境的稳定。

同样，人工合成的 Mas-DH-Ⅰ体内使用时可促进烟草天蛾的幼虫和菜粉蝶（*Pieris*

*rapae*）初羽化成虫的尿液分泌（表 6-5）。

**表 6-5 利尿因子的定位**

| 昆 虫 | 脑 | 心侧体 | 咽侧体 | 咽下神经节 | 胸部神经节 | 腹部神经节 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 大蠊 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | +++ |
| | +++ | | +++ | | | |
| 竹节虫 | +++ | +++ | 0 | +++ | --- | +--- |
| | +++ | | | | +++ | +++ |
| 飞蝗 | +++ | | | | | |
| | | | | | + | + |
| | + | ++ | | | --- | +--- |
| 沙蝗 | +++ | +++ | | | | |
| | +++ | +++ | ++ | | | |
| 黑蝗 | +++ | | | | | |
| 蟋蟀 | +++ | | | | | |
| *Acheta* | + | +++ | | + | | + |
| 蜜蜂 | | | +++ | | | |
| *Anisotarsus* | ---+++--- | | | | | |
| *Lepinotarsa* | +++ | | | | | |
| *Onymacris* | + | + | | | + | |
| 粉蝶 | ++ | +++ | | + | + | 0 |
| 斑蝶 | +++ | ---++ | --- | | ------++------ | |
| 丽蝇 | +++ | +++ | | | +++ | |
| | + | | | | | |
| 舌蝇 | +++ | | | | | ---+++--- |
| Corethra | | | | | 0 | +++ |
| 按蚊 | +++ | | | | + | |
| 伊蚊 | +++ | | | | + | |
| 吸血蝽 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ |
| 红蝽 | +++ | + | 0 | 0 | ---+--- | |

注：表中同一种不同行表示不同文献的结果。

### 1.3 存在部位

DH的存在部位在不同昆虫中存在差异。表 6-5 中统计了蜚蠊目、直翅目、鳞翅目、膜翅目和双翅目等20种昆虫的DH存在部位。统计结果表明，DH几乎存在于整个神经系统中，而以脑和心侧体中最为普遍。

### 1.4 释放部位和作用模式

在吸血性昆虫中，DH的释放十分迅速。吸血蝽只需 3min（Maddrell，1963），按蚊只需 1min（Nijhout et al，1978）。在沙漠蝗中，脑桥体中的利尿因子由心侧体神经Ⅰ（NCCⅠ）运至心侧体中贮存（Goldsworthy et al，1972）。对于那些利尿因子贮存于腹神经索的昆虫而言，DH的释放部位也位于腹神经索上。如吸血蝽的DH释放部位在 3 对腹神经的近神经节处，舌蝇则位于腹神经上。

利尿激素作用方式类似于胺类激素，如 5-羟色胺及肾上腺素。尿的分泌是由钾离子的主动运输驱动的。这种驱动引起氯离子和水的被动运输，从而产生尿液。5-羟色胺作用于马氏管管壁细胞膜上的受体，使膜上磷脂酰肌醇（phsphatidylinositol）水解，打开钙离子通道，从而提高钙离子的通透性，钙离子进入膜内，有助于提高 cAMP 的水平。cAMP 又可能促使钙离子在胞内贮存以增强 5-羟色胺对钙离子的直接作用。同时，由于 cAMP 水平的增加，活化钾离子泵，激活钾离子穿过马氏管管壁细胞顶膜的主动运输，氯离子的通透性也随着增加，水分则随钾离子、氯离子的移动而进入管腔。

切断腹神经索或去头，可引起多种昆虫的尿液排泄受阻。如甲虫 *Anisotarsus*、马铃薯甲虫、库蚊，飞蝗和舌蝇。这表明 DH 的释放可能与脑有关。在飞蝗、红蝽、吸血蝽和按蚊等昆虫中，取食可刺激 DH 的释放。Maddrell（1964）经过多次试验证实，吸血蝽 DH 的释放由腹部膨压引起。

在沙漠蝗中，来自心侧体的 DH 分解速率为 0.05～0.15ml/h。在吸血蝽血淋巴中 DH 在血餐后含量非常丰富，但在泌尿结束 2h 后完全消失。在红蝽、*Carausius* 和舌蝇中，马氏管降解血淋巴中的 DH 而控制其在血液中的浓度。这可能是由马氏管细胞中分子质量为 4 500u 的金属内切酶降解。

## 2 抗利尿激素

### 2.1 化学结构

抗利尿素（ADH）已从家蟋蟀心侧体中分离得到，但其氨基酸序列至今仍未见报道。

### 2.2 生理功能

家蟋蟀 ADH 通过抑制马氏管的液体分泌而起作用，但不刺激直肠对水分的回吸。失水可导致 ADH 向血淋巴中释放。

在飞蝗中，ADH 刺激直肠对水的吸收。刺激强度与剂量呈正相关。可见，失水可导致它向血淋巴中释放。飞蝗 ADH 则通过促进直肠对水的重吸收而起作用。

### 2.3 存在部位

用分离的马氏管和直肠进行的体外试验证实，抗利尿激素存在于美洲蜚蠊、折翅蠊、*Carausius*、*Clitumnus*、竹节虫、飞蝗、沙蝗、蜜蜂、*Corethra* 和红蝽中。其存在部位因昆虫种类不同而异。如美洲大蠊 ADH 主要存在于心侧体和周缘交感器官中，*Corethra* 则存在于胸部神经节中。有的昆虫则不同文献报道的结果不同，如飞蝗，Cazal 等（1968）用直肠进行的体外试验表明，飞蝗中 ADH 存在于心侧体的存贮和腺性瓣内和脑内，De Besse 等（1968）报道 ADH 仅存在于周缘交感器官中，Prou 等（1984）则认为 ADH 只存在于心侧体中。这是由于作者测定的飞蝗存在种群差异、虫态差异亦或为生理差异，仍需进行深入的研究。但从表 6-6 中易知，大多数测定的昆虫 ADH 主要存在于心侧体和脑中，故脑和心侧体应为其分泌或贮存器官。

表 6-6　抗利尿因子的定位

| 种　类 | 脑 | 心侧体 | 咽侧体 | 咽下神经节 | 胸部神经节 | 腹部神经节 | 周缘交感器官 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Periplaneta* | | + + + | | | | | + + + |
| *Blabera* | + + + | + + + | + + | + + + | + + | + | |
| *Carausius* | + + + | + + + | + + + | | | | |
| *Clitumnus* | | + + + | | | | | + + |
| Locusta | + + + | + + + | | | | | + + + |
| | | + + | | | | | |
| *Schistocera* | | + + + | | | | | |
| *Apis* | | + + + | | | | | |
| *Corethra* | | | | | + + + | | |

注：表中同一种不同行表示不同文献的结果。

DH 和 ADH 这 1 对肽激素相互颉颃，共同负责调控昆虫的水分平衡、废物排泄和离子平衡，在不断变换的条件下维持内环境的稳定。

## 第四节　激脂激素/红色素聚集素族

激脂激素（adipokinetic hormone，AKH）最先由 Stone 等在 1976 年从飞蝗（*Locusta migratoria*）心侧体分离和鉴定出，命名为激脂激素Ⅰ（AKHⅠ)。这是一个具有 10 个氨基酸的肽，广泛存在于飞蝗和沙漠蝗的心侧体中。激脂激素Ⅰ的结构与来源与甲壳动物中的红色素聚集素（red pigment-concentrating hormone，RPCH）十分相似，N-末端的 8 个氨基酸有 6 个相同，故将此族肽称为激脂激素/红色素聚集素族。

1984 年，Witten 等从美洲大蠊心侧体内分离出两个八肽。由于其具有十分显著的亲

表 6-7　AKH/RPCH 族肽类的一级结构

| 昆虫属 | 激素名称 | 结　构 |
| --- | --- | --- |
| *Pandalus* | RPCH | pQLNFSPGW-$NH_2$ |
| *Locusta* | Lom-AKH-Ⅰ | pQLNFTPNWGT-$NH_2$ |
| | Lom-AKH-Ⅱ | pQLNFSAGW-$NH_2$ |
| *Schistocerca* | Seg-AKH-Ⅱ | pQLNFSTGW-$NH_2$ |
| *Periplaneta* | Pea-CA-Ⅰ | pQVNFSPNW-$NH_2$ |
| | Pea-CA-Ⅱ | pQLTFTPNW-$NH_2$ |
| *Blaberus* | Bld-HpGH | pQVNFSPGWGT-$NH_2$ |
| *Carausius* | Cam-HpGH | pQLTFTPNWGT-$NH_2$ |
| *Manduca* | Mas-AKH | pQLTFTSSWG-$NH_2$ |
| *Gryllus* | Grb AKH | pQVNFSTGW-$NH_2$ |
| *Romalea* | Rom-AKH | pQVNFTPNWGT-$NH_2$ |
| | Hez-HpTH | pQLTFSSGWGN-$NH_2$ |
| *Tabanus* | Taa-AKH | pQLTFTPGW-$NH_2$ |
| | Taa-HoTH | pQLTFTPGWGY-$NH_2$ |
| *Empusa* | Emp-AKH | pQVNFTPNW-$NH_2$ |
| *Polyphaga* | Poa-HTH | pQITFTPNW-$NH_2$ |

肌活性，被命名为M-Ⅰ和M-Ⅱ，或根据其分离部位命名为CC-Ⅰ和CC-Ⅱ。这两个八肽注射入蜚蠊体内后，表现出很强的高血糖活性，因而又称为高血糖激素（hyperglycemic hormone HGH），以Pea-CA--Ⅰ和Pea-CA--Ⅱ的名字列于表6-7中。到1988年，这一家族的数目增加到14个，目前AKHs已增到32个以上（Gäde et al，1997）。

## 1 化学结构

AKH是8～10个氨基酸的短肽，它们具有相似的结构。其N端为焦磷酸谷氨酸（pGlu），C端酰胺化，这使AKHs不为大多数内肽酶所降解；AKH在4、8位均具有苯丙氨酸、酪氨酸残基，2位上为亮氨酸、缬氨酸或异亮氨酸，3位上为天冬酰胺或苏氨酸，5位上则可能是丝氨酸或苏氨酸。所有AKHs均为疏水性化合物，不具有酸性或碱性氨基酸残基。

Stone及其同事（1978）研究了AKH结构与活性的关系，结果表明，AKH的活性表达需要封闭的末端和至少8个氨基酸残基。用焦谷氨酸的L-对映体取代D-焦谷氨酸，并不显著影响AKH的活性。9位和10位上的双肽$Gly_9$-$Thr_{10}$的顺序对AKHⅠ的活性表达似乎很重要，两者换位后对AKHⅠ活性影响很大。

## 2 虫体内的分布

从目前的研究结果可知，AKH类至少存在于10个目的昆虫中。但表6-7中所列出的16种激脂激素主要由不完全变态类的直翅目和蜚蠊目昆虫产生。如直翅目中的飞蝗、沙漠蝗、笨蝗、二点蟋蟀，蜚蠊目中的美洲大蠊、折翅蠊。其次是全变态类的鳞翅目和双翅目昆虫，如鳞翅目的烟草天蛾、美洲棉铃虫，双翅目的虻类。

Schooneveld等（1987）应用AKH-Ⅰ的N-末端或C-末端链的区位专一性抗体，采用免疫化学的方法测定了10个目中19种昆虫的心侧体。研究结果表明，除了两种双翅目昆虫外，其他昆虫的心侧体细胞均可被一种或两种抗体免疫染色。而这两种双翅目昆虫的脑内也很可能存在可与N-末端序列肽链的抗体反应的抗原。此外，Brown和Lea（1988）证实埃及伊蚊脑内和腹神经节中的单侧细胞群（unpaired cells）中具有AKH免疫反应。

AKHs主要由心侧体产生和释放。Diederen等（1987）的试验结果表明，AKH-Ⅰ和AKH-Ⅱ在飞蝗和沙漠蝗中均由心侧体中相同的细胞群合成，Hekimi和O' Shea（1987）采用放射性氨基酸培养沙漠蝗心侧体后，得到了两种AKH-Ⅰ前体。此外，飞蝗和沙漠蝗的脑也能合成部分AKHs。

## 3 生理功能

研究表明，AKHs的生理功能是多种多样的，包括激活脂肪和糖的代谢、抑制脂肪体中蛋白质合成和脂肪酸合成，刺激骨骼肌或心肌搏动，刺激保幼激素调控蛋白的合成等等。

昆虫心侧体释放的激脂激素是调控脂代谢的重要因素。它不仅具有促进甘油二酯的合成作用，还能使已存在的甘油三酯进行部分降解作用。昆虫飞行时动用脂类供应能量，是

由激脂激素控制的，AKH的作用是诱导较早地利用脂类作为能源。蝗虫在飞行的最初5～10min内，飞行速度很高，然后逐渐降低，约经25min后即达到一个恒定的速率。在起始的高速飞行期间，碳水化合物是优先动用的燃料，而在低速和恒速飞行期间，就改用脂类作为能源物质，而且在起飞以后需要经过一个短暂时间的延搁，才开始分泌AKH，即在飞行肌利用甘油二酯作为能源时，需要AKH起作用。AKH-Ⅰ和AKH-Ⅱ的释放，导致脂肪体中脂类物质的释放。这些脂类通过血淋巴而运输到飞行肌中，作为能源物质而维持成虫的持续飞行。

同一类神经分泌细胞，同时释放不同种类的AKHs，表明它们各自具有不同的功能。Goldworthy等（1986）的研究表明，与AKH-Ⅰ相比，AKH-Ⅱ作用于飞蝗的脂肪体后，使脂肪体细胞内积累更多的cAMP。Carlisle等（1988）对脂肪体的体外培养试验表明，生理浓度的AKH-Ⅱ刺激碳水化合物的释放，而AKH-Ⅰ要达到同样刺激效果需要更大的剂量。在美洲棉铃虫中，两种结构十分类似的AKH类似物却具有完全不同的功能。Mas-AKH只刺激脂肪的释放，而Hez-HpTH则主要刺激血淋巴中海藻糖浓度的提高。

Gokuldas等（1988）在体外培养的沙漠蝗脂肪体内加入AKHⅠ或AKHⅡ后发现，AKHⅠ和AKHⅡ除可刺激二酰甘油从脂肪体释放外，还能显著抑制脂肪体中脂肪酸的合成。

## 4 释放调控和作用原理

AKHs的释放由起源于飞蝗原脑并通往心侧体的神经控制。这些神经由生物胺能神经原发出，有突触与AKHs分泌细胞接触。研究表明，AKHs的释放直接受控于脑中枢。脑中枢的指令通过神经递质章鱼胺的释放而传达。章鱼胺启动第二信使cAMP，由后者刺激心侧体中的神经分泌细胞释放AKHs。细胞外钙离子也参与了这一过程。

对沙漠蝗的研究表明，激脂激素（AKH）的作用是通过第二信使系统。

在激素刺激的脂动反应（adipokinetic response）中，关键的反应是cAMP的参与作用。按照AKH的酯酶活化作用解释认为，腺苷酸环化酶是膜受体的一部分，当激素与受体结合后，活化腺苷酸环化酶，产生cAMP。cAMP激活蛋白激酶，活化的蛋白激酶激活酯酶，有活性的酯酶催化甘油三酯转化成甘油二酯释放进入血淋巴。cAMP可被磷酸二酯酶（PDE）分解成5’AMP。反应中腺苷酸环化酶及PDE共同调节cAMP的浓度。两种酶都可由钙离子调节。家蚕脂肪体的腺苷酸环化酶，在低钙离子浓度下被激活，而在高钙离子浓度下被抑制。与哺乳动物类似，PDE也可被钙离子激活，当细胞内钙离子浓度短暂增加时，首先刺激cAMP的合成，次后又促其降解成5’AMP。磷酸化酶的激活也依赖于钙离子，在蝗虫脂肪体中，通过AKH，也通过钙离子激活磷酸化酶使葡萄糖转化成甘油-3-磷酸，维持适当的甘油-3-磷酸库，在甘油三酯转化成甘油二酯期间有助于维持甘油二酯的总量。

章鱼胺诱导的高血脂作用（hyperlipaemic effect）与AKH诱导的作用相似，但有区别。可能通过相似的细胞内机理。区别在于：章鱼胺的高血脂作用可被α-受体的阻断剂酚妥拉明所阻断，而AKH作用则不阻断；脂肪体蛋白质合成可被AKH所阻断，但不受章鱼胺的影响。在飞行的蝗虫中，在开始飞行后短期内可能由章鱼胺和AKH顺次作用，为

飞行肌提供脂类。在沙漠蝗飞行最初 10min，章鱼胺浓度迅速上升，血淋巴脂类也随之上升，但未见 AKH 滴度上升。

## 5 生物合成与降解

AKHⅠ、AKHⅡ在飞蝗心侧体内的生物合成是比较复杂的。近年应用分子克隆技术和蛋白质序列测定，鉴定了 AKH 的前体和一种尚不了解功能的、与 AKH 同时合成、贮存、释放的新肽——AKH 前体相关肽 APRP，终于弄清了飞蝗 AKH 生物合成的全过程。

在飞蝗的心侧体细胞中，AKH 的两种 mRNA 转译产生前原 AKHⅠ（信号肽＋原 AKHⅠ）和前原 AKHⅡ（信号肽＋原 AKHⅡ）。在去掉信号肽后，原 AKHⅠ（A 链）和原 AKHⅡ（B 链）形成 3 个二聚体（A＋A）、(A＋B)、(B＋B)。经加工（A＋ A）分解为 AKHⅠ和同型二聚体 APRP1，（A＋B）分解为 AKHⅠ、AKHⅡ和异型二聚体 APRP2，(B＋B）分解为 AKH Ⅱ和同型二聚体 APRP3。上述结果表明，AKHⅠ和Ⅱ的直接前体不是直链的原激素，而是二聚体。这在肽类激素生物合成中是首次发现，对调控可能有特殊意义（O' Shea et al, 1990）。

烟草天蛾的 AKH 基因也已分离鉴定，从基因的 DNA 序列推导出了 AKH 前体的全部结构（Bradfield et al，1989）。

Siegert 等（1987）的研究表明，AKHⅠ由飞蝗的马氏管降解，降解后得到 3 个产物，经生物测定可知，降解后的 3 个产物均失去了激脂活性。

# 第五节 亲肌肽类

亲肌肽类（Myotropins）的生理功能是引起直肠肌、心肌、骨骼肌等的特异性收缩。由于亲肌肽重要的生理功能，早在 20 世纪 60 和 70 年代，许多昆虫学家便投身到分离它们的工作中去。Brown（1965）从美洲大蠊的心侧体中分离到几种亲肌因子：第一种可促进心脏的特异性收缩，第二种则作用于后肠，第三种对这两种靶标均有效。同样在这种昆虫的心侧体中，随后又陆续发现了 4 种心动加速因子，这些因子显著区别于高血糖因子。在飞蝗中，Mordue 等（1969）从心侧体中分离到两个肽类组分。这两个组分具有加速心动和促高血糖活性。

Gersch 及其合作者在美洲大蠊的中枢神经系统中发现了 4 种心脏促动因子，称为 C1、C2、D1 和 D2。这 4 种因子均能增加心脏的搏动频率，但它们对心脏振幅的影响不同。D1 增大振幅，C1 减小振幅，而 C2 和 D2 对振幅无影响。C1 和 D1 还刺激竹节虫的色素移动，激发蜚蠊节律性神经活动。

以上初步研究结果表明，亲肌因子广泛存在于多种昆虫的不同器官中。

## 1 亲肌肽类的分类

亲肌肽类中种类很多，据 Gäde 等（1997 年）报道，已经达到 80 多种，根据功能和结构，将它们分为 8 大类，列于表 6-8 中。

表 6-8 亲肌肽的一级结构

| 名称 | 结构 |
|---|---|
| Proctolin (Pea M) | RYLPT-OH |
| Leucokinin Ⅰ (Lem-K-Ⅰ) | DPAFNSWG-$NH_2$ |
| Leucokinin Ⅱ (Lem-K-Ⅱ) | DPGFSSWG-$NH_2$ |
| Leucokinin Ⅲ (Lem-K-Ⅲ) | DQGFNSWG-$NH_2$ |
| Leucokinin Ⅳ (Lem-K-Ⅳ) | DASFHSWG-$NH_2$ |
| Leucokinin Ⅴ (Lem-K-Ⅴ) | GSGFSSWG-$NH_2$ |
| Leucokinin Ⅵ (Lem-K-Ⅵ) | pQSSFHSWG-$NH_2$ |
| Leucokinin Ⅶ (Lem-K-Ⅶ) | DPAFSSWG-$NH_2$ |
| Leucokinin Ⅷ (Lem-K-Ⅷ) | GADFYSWG-$NH_2$ |
| Leucopyrokinin (Lem-PK) | pQTSFTPRL-$NH_2$ |
| Leucosulfakinin Ⅰ (Lem-SK-Ⅰ) | EQFEDY ($SO_3$) GHMRF-$NH_2$ |
| Leucosulfakinin Ⅱ (Lem-SK-Ⅱ) | pQSDDY ($SO_3$) GHMRF-$NH_2$ |
| Drosulfakinin Ⅰ (Drm-SK-Ⅰ) | FDDY ($SO_3$) GHMRF-$NH_2$ |
| Drosulfakinin Ⅱ (Drm-SK-Ⅱ) | GGDDQFDDY ($SO_3$) GHMRF-$NH_2$ |
| Locustamyotropin Ⅲ (Lom-M-Ⅲ) | RQQPFVPRL-$NH_2$ |
| Locustamyotropin Ⅳ (Lom-M-Ⅳ) | RLHQNGMPFSPRL-$NH_2$ |
| Locustapyrokinin (Lom-PK) | pQDSGDGWPQQPFVPRL-$NH_2$ |

## 2 化学结构

直肠肽（proctolin）是 1975 年 Starratt 和 Brown 从美洲大蠊（*P. americana*）中分离并测定的一种碱性短肽，可显著刺激美洲大蠊后肠肌的收缩，其分子质量为 648u，不被胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、羧肽酶 A 和 B 破坏，可被亮氨酸氨肽酶破坏。1977 年被 Starratt 和 Brown 合成。直肠肽是一种戊肽，顺序为精氨酸-酪氨酸-亮氨酸-脯氨酸-苏氨酸（Starratt et al，1975）。

Holman 等（1979）通过比较分泌部位、热稳定性和酶解失活的差异，对马得拉蜚蠊亲肌肽进行了研究，结果表明，直肠肽不是唯一引起后肠收缩的神经肽。在脑和中枢神经系统中，还存在一类后肠激发神经肽（HSN）。Holman 等从 1976—1987 年的 10 多年中，通过 HPLC、酶解失活、氨基酸测序、一级结构测定和快中子轰击质谱等方法，从马得拉蜚蠊中分离纯化了 11 种亲肌素。其中 8 种的结构十分相似，命名为 leucokinin Ⅰ～Ⅷ（Lem-K-Ⅰ到Ⅷ）。这 8 种 leucokinin 在 4、6、7 和 8 位上具有相同的氨基酸，分别是苯丙氨酸、丝氨酸、色氨酸和甘氨酸，除 Lem-K-Ⅵ外，其他肽的 N-末端均未封闭。

Lem-PK 是 Holman 等（1986）从马得拉蜚蠊中分离纯化。Lem-PK 的氨基酸有 50% 与蜚蠊心动加速肽 Pea-SK-Ⅰ相同。由于 Lem-PK 在 8 位上不具有色氨酸，因而很有可能无高血糖活性；加之在 AKH/RPCH 族中无任何 1 个肽像 Lem-PK 一样，在 1μmol/L 浓度时可刺激蜚蠊的后肠，因而将 Lem-PK 放于亲肌肽族中。

蜚蠊中的另外两个亲肌肽即硫激肽 Lem-SK-Ⅰ和 Lem-SK-Ⅱ由 Nachman 等（1986）分离纯化。Lem-SK-Ⅰ和 Lem-SK-Ⅱ是第一个在无脊椎动物中发现的具有硫酸化酪氨酸残

基的神经肽。Lem-SK-Ⅰ是 EQFEDY（$SO_3H$）GHMRFamide Lem-SK Ⅱ是 pQ SDDY（$SO_3H$）GHMRFamide。这两个肽与人的脑—肠肽缩胆囊素（cholecystokinin）、促胃液素（gastrin）结构相似，不仅 C-末端氨基酸残基具有高度同源性，而且都具有硫酸化的酪氨酸残基。Lem-SK-Ⅰ和 Lem-SK-Ⅱ与 FMRFamide 族肽、CCK 和 coerulin 也高度同源。Lem-SK-Ⅱ的氨基酸残基 Asp3、Gly6、Met8 和 Phe10 与 CCK 的相同位置的残基相同，其残基 Tyr（$SO_3$）5、Gly6、Met8 和 Phe10 与人的促胃液素的 12、13、15 和 17 位的残基相同。Lem-SK-Ⅰ和 Lem-SK-Ⅱ C-末端酰胺化，Lem-SK-Ⅱ的 N-末端也由焦谷氨酸封闭。它们的人工合成产物对马得拉蜚蠊的中肠均具明显的激活作用，表明结构鉴定的正确性。

Drm-SKs 的序列是 Nichols 等（1988）应用 Lem-SKs 和 cholecystokinin \ gastrin 族专一性寡聚核苷酸探针，从果蝇染色体组 DNA 文库和 cDNA 文库核苷酸序列中推导而来。其人工合成产品对分离的蜚蠊后肠具有促肌活性。

## 3 虫体内的分布

直肠肽在半翅目、鞘翅目、鳞翅目、双翅目、蜚蠊目及膜翅目的 20 种昆虫以及甲壳类等其他无脊椎动物中分布，这种肽无种的专一性。直肠肽在昆虫组织中的分布也较为广泛，直肠肽存在于美洲大蠊的后肠中。此外，直肠肽在马得拉蜚蠊、沙蝗和家蟋蟀中还分布于中枢神经系统，尤以胸部和腹末神经节中含量较多（表 6-9）。

**表 6-9 几种昆虫神经系统中直肠肽的浓度**（pmol/器官）

| 昆虫种类 | 脑 | 胸神经节 1 | 胸神经节 2 | 胸神经节 3 | 腹神经节 1-5 | 腹神经节 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Leucophaea* | 0.20 | 0.45 | 0.54 | 0.55 | 0.11 | 0.68 |
| *Schistocerca* | 0.47 | ——— | 0.37 | ——— | 0 | 0.17 |
| *Acheta* | 1.50 | ——— | 0.87 | ——— | 0.07 | 0.74 |

Leucokinin、Lem-PK 和 Lem-SKs 发现于马得拉蜚蠊中，它们主要存在于脑内。此外，也见于心侧体、周缘交感器官。可能由脑分泌后，通过心侧体和/或周缘交感器官释放至血淋巴。目前这些肽类尚未见有在其他昆虫中存在的报道。

Drm-SKs 应存在于果蝇中，但至今仍未见分离报道。Lom-Ms 和 Lom-PK 存在于蝗虫中。看来，在亲肌肽族中，除直肠肽外，其他种类均具有种属间的专一性。

## 4 结构与活性的关系

应用人工合成的直肠肽类似物，处理后肠、心脏、飞蝗胫节展肌等不同效应器，测定了活性与结构的关系。测定结果表明，直肠肽的每一个氨基酸对活性表达都是不可缺少的，甚至连羧基基团也不可更换。但移去 2 位酪氨酸上的酚羟基对活性表达无影响。卤化酪氨酸 4 位上的酚羟基使活性略为增加。

改变 2 位上的酪氨酸，合成了 5 个直肠肽类似物，测定它们对蜚蠊和黄粉虫心脏的促动活性。发现当酪氨酸 4 位上的酚羟基被含氮基团如 $NH_2$，$NO_2$，$NMe_2$ 和 NMe。可能是这一改变降低了直肠肽水解速率。但用飞蝗胫节展肌测定上述类似物得到了不同结果，这表明可能存在不同类型的直肠肽受体。

## 5 活性和作用机理

蜚蠊的肛道肌肉对直肠肽反应阈限水平约为0.5mg/ml。因此，大约分子质量为500u的直肠肽，在浓度为$10^{-9}$mol浓度的范围内是有效的。

直肠肽除引起直肠收缩外，还对多种昆虫的心肌，美洲大蠊的触角辅搏动器，丝光绿蝇的体壁肌及虻属、飞蝗和蟋蟀的侧输卵管、马得拉蜚蠊的前肠、飞蝗的胫节展肌和蜚蠊的基节降肌均具有明显的促动作用

直肠肽是某些运动神经元中的辅助递质（co-transmitter），与通常的兴奋性神经肌肉突触递质（一般认为是谷氨酸L-Glu）同时存在，但生理意义不同。这类运动神经元也称为直肠肽能神经元（proctolinergic neurons）。如美洲大蠊Ds运动神经元、蝗虫*Schistocerca* sp. 慢速胫节伸肌运动神经元。直肠肽引起肌肉慢速、持续性收缩，而不使之去极化；L-Glu则引起肌肉去极化和快速、短暂的收缩。研究表明它们在厩蝇（*Stomoxys calcitrans*）产卵管肌肉上药理性质不同 直肠肽的兴奋阈值为$10^{-13}$~$10^{-10}$mol/L，L-Glu则为$10^{-4}$~$10^{-3}$mol/L。

蜚蠊后肠的leucokinin感受器对Leucokinin N-末端的短肽较为灵敏，4~8位的残段具有与八肽母链同样的活性。而C-末端无活性。同样，Lem-PK的活性由N-末端的残段决定，4~8位氨基酸残基是Lem-PK的活性中心，而C-末端无活性。

Leucokinin对激活的肌肉种类具有选择性。除了不具神经突触的后肠肌外，它们在生理浓度范围内几乎不激活其他任何内脏肌。试验表明，若要激活蜚蠊前肠和输卵管上的肌肉，所需leucokinin的浓度比激活后肠肌时分别高100和1 000倍。

此外，leucokinin还具有一些奇特的作用。Hayes等（1989）报道，合成的leucokinin可使埃及伊蚊离体马氏管的跨管电压去极化，这种生物作用依赖于氯离子浓度。其中Lem-K-Ⅷ在低浓度（10pmol/L）时抑制马氏管的跨管壁液流分泌，而在高浓度（3.5nmol/L）时却刺激液流分泌。Hayes等据此认为，leucokinin增加了氯离子的跨管壁渗透性，从而增加了可用的氯离子浓度，这些氯离子在分泌钠、钾和水时是必须的。这一结果说明，伊蚊的利尿激素可能与leucokinin在结构上相似。

## 6 亲肌肽受体

大量的受体研究集中于飞蝗胫节展肌。Evan等从1978~1981年，应用α-肾上腺素能激动剂（clonidine和tolazaline）和颉颃剂（酚妥拉明和propranolol），研究了胫节展肌上的受体类型。结果表明存在3种类型的受体，1种位于慢舒张性运动神经元上，即位于前跗节，而另外2种受体位于胫节肌纤维上。

## 7 亲肌肽的失活

注射进入血淋巴中的直肠肽的半分解期不到5min。这表明若没有保护，直肠肽不能在血淋巴中运输。在美洲蜚蠊中，直肠肽的失活有3条途径。在pH6.0从Pro-Thr处剪切，在pH8.0从Tyr-Leu处剪切，在两种pH条件下均可从Arg-Tyr处剪切。由于不同的生理状况下蜚蠊血淋巴中的pH不同。而不同的剪切方式直肠肽失活的速率又存在差异。

无疑，直肠肽降解代谢的这种多样性决定了在不同生理状况下直肠肽到达靶标的量和存在寿命。

直肠肽在其他组织的代谢也进行了研究。在其他组织中，直肠肽的降解产物大多为Arg-Tyr，直肠肽含量越多的组织，其代谢速率也越快。这可能是在不同组织中酶类或酶库源大小不同。直肠肽的多数酶解活性均由可溶性酶因子提供，而非膜内酶系的作用结果。

## 第六节 FMRF-$NH_2$的相关神经肽

FMRFamide相关肽是在无脊椎动物中广泛存在的神经肽，最初从软体动物蛤中发现并分离得到。它们是软体动物中的心动加速因子。对Phe-Met-Arg-Phe-amide和亮氨酸类似物FLRFamide起免疫反应的动物中，都有这种肽，几乎广泛分布于整个动物界。从功能看，它也属于亲肌肽。

### 1 化学结构

Holman等（1984）用高效液相色谱分离、纯化马得拉蜚蠊亲肌肽时发现一个组分可显著抑制分离的蜚蠊后肠的节律性收缩。之后（1986）他们又经过连续几次分离和纯化，终于分离到了这一组分，纯化程度达98%，并测定出这一纯化肽中含有1mol/L的谷氨酸、组氨酸、精氨酸和亮氨酸，2mol/L的天门冬氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸。

将此肽与氨肽酶一起培养，并未使之失去活性，这表明该肽N-末端封闭。由于该肽中具有1mol/L谷氨酸，故N-末端应为焦谷氨酸封闭。采用焦谷氨酸氨肽酶降解，HPLC分离，气相测序仪测序，测定了该肽的结构。随后他们采用人工合成并与自然分离肽比较的方法，HPLC分离和生测结果均表明，此肽的C-末端也是封闭的。从而确定了该肽的结构（表6-10）。命名为马得拉蜚蠊肌肉抑制素（Leucomyosuppressin，Lem-MS）。

表6-10 FMRF-$NH_2$族肽类的一级结构

| 名 称 | 结 构 |
| --- | --- |
| *Leucophaea* MS（Lem-MS） | pQDVDHVFLRF-$NH_2$ |
| *Drosophila* | DPKQDFMRF-$NH_2$ |
| | TPAEDFMRF-$NH_2$ |
| | NAVVLHFQKF-$NH_2$ |
| | SVQDNFMHF-$NH_2$ |
| | AAMDRY-$NH_2$ |
| | SDNFMRF-$NH_2$ |
| | SPKQDFMHF-$NH_2$ |
| | PDNFMRF-$NH_2$ |
| | MDSNFIRF-$NH_2$ |
| | S（A，R）PQDFVRS-$NH_2$ |
| | KRRSVQDNFMHF-$NH_2$ |

1988年，Schneider等对果蝇的FMRF-$NH_2$相关肽的染色体组基因cDNA分离和测序，结果从染色体基因组文库中发现了5个阳性克隆，从cDNA文库中发现了2个阳性克

隆。通过比较阳性克隆大小和对内切酶的反应，发现从 cDNA 文库中筛选的 2 个阳性克隆相同，对标号为 Mt-8 的阳性克隆测序后可知，这个克隆含核苷酸 1 352bp，可读框共编码 342 个氨基酸，去除信号肽后，剩余序列串联排列 15 个多肽。这 15 个多肽中 10 个具有 FMRFamide 结构，其中 DPKQDFMRF 具有 5 个重复，TPAEDFRMF 具有 2 个重复，另外 3 个 PDNFMRF、SPKQDFMRF 和 SDNFMRF 为单拷贝。此外，还有 3 个肽的 N-末端具有 FMRF-$NH_2$ 相似结构，它们的 N-末端分别为 FMHF-$NH_2$、FVRS-$NH_2$ 和 FIRF-$NH_2$。

Nambu 等（1988）对果蝇的基因分离和测序后，对核苷酸序列分析时也发现了一系列的 FMRF-$NH_2$ 相关肽，除了与 Schneider 等的结果相同的 FMRF-$NH_2$ 族肽外，不同的主要有 NAVVLHFQKF、SVQDNFMHF 和 AAMDRY 等 3 个。此外，Nambu 等利用肽类分离和测序技术验证了 DPKQDFMRF－$NH_2$ 确实存在于果蝇的头内。其他相关肽是否也表达仍需进一步的研究证实。

## 2 生理功能

Lem-MS 在浓度高于 0.08nmol/L 时可抑制蜚蠊离体后肠的自发性收缩，当浓度达到 lumol/L 时，抑制作用消失。Yamamoto 等（1988）的研究表明，Lem-MS 可减少黄粉虫（*Tenebrioy molitor*）骨骼肌上兴奋性运动神经元突触前膜处兴奋性递质的释放，但对这类运动神经元的突触后膜无作用。虽然 Yamamoto 等未能弄清 Lem-MS 抑制兴奋性运动神经元突触前膜的机制，但初步的试验结果证实，花生四烯酸的代谢产物可能作为 Lem-MS 的第二信使。

## 3 虫体内的分布

已经证实 FMRFamide 相关神经肽存在于飞蝗、沙漠蝗和伊蚊中。此外，由于在果蝇头中已经检测到 DPKQDFMRF-amide，故这类肽也存在于果蝇中。研究表明，这类神经肽存在于这些昆虫中枢神经系统的神经元和神经分泌细胞中。

# 第七节 滞育激素

许多种类的昆虫都有卵滞育。卵滞育可以发生在胚胎发育的任何一个阶段。如可以发生在刚好形成胚带之后，也可发生在胚动前后（一般接近胚胎发育的中期），或者发生在即将孵化前。胚胎滞育由滞育激素（Diapause Hormone，DH）引起。已知的胚胎滞育激素的知识是对家蚕的研究取得的。家蚕卵的发育依赖于它的母代在幼虫期时所处的光周期情况。在短日照（如在春季生长）的条件下，雌性幼虫发育形成的成虫产不滞育的卵；而在长日照的条件下，雌性幼虫发育形成的成虫产的卵是滞育的。可见，家蚕胚胎滞育由母体预决定。

## 1 分离与纯化

家蚕胚胎滞育由母体预决定，这引起研究者从母体中寻找决定滞育的因子。

Umeya（1926）的实验表明，卵巢盘只有植入滞育性幼虫中，才能产滞育性卵。这暗示诱导滞育卵产生的因子可能存在于血淋巴中。通过摘除、植入的方法。Fukuda（1951，1952）和 Hasegawa（1951，1952）各自独立地确认咽下神经节是调控产生滞育性卵的器官，并认为咽下神经节的活动受脑的控制。经过数年努力，从滞育性蛹的脑-咽下神经节复合体中，抽提到诱导卵滞育的蛋白质因子，并命名为滞育激素（Hasegawa，1957）。

由于当时方法的落后，DH 的分离和纯化十分困难。用 400 万个雌蛾头作材料，用三氯甲烷和甲醇（1:1）混和液抽提并以柱层析分离，得到一个具活性的分子质量为 3 300u 的单峰，即后来称为 DH-A 的物质（Isobe et al，1973）。第一次抽提后的残渣粉碎，同样方法分离到分子质量为 2 000u 的活性分子，称为 DH-B（Kubota et al，1979）。用此方法得到的 DH 继续纯化，由于量少而得不到纯品（Imai et al，1982）。1986 年开始改变分离、纯化方法，先用乙醇，三氯甲烷和甲醇（1:1）混合液，80%乙醇水溶液和 50%的 2-丙醇水溶液顺次浸洗，洗液于水浴中用蒸馏水抽提 10min，活性成分存在于热水中，此成分经 2 次反相高效液相色谱后，从 55 000 个第一天蛹咽下神经节中得到约 800ng 的 DH。纯化近 60 万倍。每头蛹注射 30ng，即能诱导 25%卵的滞育（Imai et al，1991；Sata et al，1992）。

## 2 化学结构

用 Edman 降解法测得了 DH 的一级结构。完整分子含 24 个氨基酸残基，C-末端酰胺化。其中第 19 位未得到阳性信号，假定为半胱氨酸或色氨酸。人工合成的未酰胺化的肽无活性（Imai et al，1991）。进一步说明天然 DH 应是肽酰胺。合成 19 位分别为 Cys 和 Trp 的 DH，二者具有同样的反相高效色谱洗脱活性。生物测定结果表明，前者在高剂量时略强，后者在低剂量时略强（Ikeda et al，1993）。最后，从 cDNA 上推断第 19 位为 Trp（Sato et al，1992）。DH 的 C-末端的 5 个氨基酸残基结构为 FXPRL-amide，具有与 PBAN 和亲肌肽同样的结构序列。但它们却具有不同的生理功能。可见，肽链的其余部分对决定这些肽的生理功能具有一定的作用。

## 3 cDNA 和前体结构

DH 的 cDNA 的碱基全序列的克隆、测序由 Sato 等（1993）和 Kawano 等（1992）同时完成。他们依据 DH 氨基酸序列合成探针，从咽下神经节 cDNA 文库中筛选出阳性克隆。测定其中最大克隆的核苷酸序列，得到完整的 cDNA 结构。

研究结果表明，编码 Bom-DH 的基因约有 800bp，在 5'-端的非翻译区，以 1 个转录共有区 ATCACTT 开始，紧靠起始密码子 ATG 上游，有一翻译共有区，碱基序列为 AACAACAAAA,随后的可读框编码 192 个氨基酸，从 Met-1 到 Cys-23 是一个疏水序列，为真核生物的信号肽；从 Thr-24 到 Leu-47 为家蚕滞育激素 DH，Gly-48、Lys-49 和 Arg-50 是 DH 翻译后加工时胰蛋白酶的酶切位点。加工时从 Lys-49 剪开，并用 Gly-48 的氨基将 Leu-47 酰胺化，从而形成 DH 的酰胺化 C-端。Bom-PBAN Ⅰ 位于 126～158 位，全长 33 个氨基酸，Bom-PBAN Ⅱ 则为 125～158 位，全长 34 个氨基酸。在此可读框内，还有 3

段同样具有 FXPKL 保守序列的肽类：①从 97～103 位，是含有 7 个氨基酸的肽 α-SGNP；②从 106～122 位全长 17 个氨基酸的 β-SGNP；③从 161～168 位是含有 8 个氨基酸的 γ-SGNP。此外，在 DH 和 α-SGNP 之间和 γ-SGNP 之后，还分别有全长 44 个和 22 个氨基酸残基的肽，其生理功能至今未见报道。3'-端非翻译区具有 3 个 AATAAA 共有区和典型的 Poly（A）尾端（图 6-5）。

```
ATCACTTCGCCCTCCAACCATGAAGGGA
CAACAACAAAA ATG TAT AAA ACC AAC ATT GTT TTC AAC GTT TTA GCT TTG GCA TTG    45
            Met Tyr Lys Thr Asn Ile Val Phe Asn Val Leu Ala Leu Ala Leu    15

TTC AGT ATT TTC TTC GCG AGT TGC ACG GAT ATG AAG GAT GAA AGC GAC AGA GGA    99
Phe Ser Ile Phe Phe Ala Ser Cys Thr Asp Met Lys Asp Glu Ser Asp Arg Gly    33
                                            DH
GCT CAC AGT GAG CGG GGC GCT CTC TGG TTC GGC CCC AGA CTC GGG AAG CGA TCA   153
Ala His Ser Glu Arg Gly Ala Leu Trp Phe Gly Pro Arg Leu[Gly Lys Arg]Ser    51

ATG AAG CCA TCC ACT GAA GAT AAC AGG CAA ACC TTC CTG AGG CTG CTC GAG GCG   207
Met Lys Pro Ser Thr Glu Asp Asn Arg Gln Thr Phe Leu Arg Leu Leu Ala Ala    69

GCT GAT GCC CTC AAA TTT TAT TAC CAC CAG CTA CCT TAC GAG AGG CAA GCC GAT   261
Asp Ala Leu Lys Phe Phe Tyr Tyr Asp Gln Leu Pro Tyr Glu Arg Gln Ala Asp    87

GAA CCG GAA ACC AAA GTA ACA AAG AAG ATC ATC TTC ACC CCC AAA CTC GGG AGG   315
Glu Pro Glu Thr Lys Val Thr[Lys Lys]Ile Ile Phe Thr Pro Lys Leu[Gly Arg]  105
                                            α-SGNP
AGC GTC GCC AAA CCC CAG ACG CAT GAA AGC CTC GAA TTC ATC CCC CGG CTC GGA   369
Ser Val Ala Lys Pro Gln Thr His Glu Ser Leu Glu Phe Ile Pro Arg Leu[Gly   123
                    β-SGNP
AGG CGG CTC TCT GAG GAC ATG CCT GCT ACG CCA GCT GAC CAG GAA ATG TAC CAA   423
Arg]Arg Leu Ser Glu Asp Met Pro Ala Thr Pro Ala Asp Gln Glu Met Tyr Gln   141
                                Bom-PBAN
CCT GAC CCC GAA GAA ATG GAG TCA AGA ACA AGA TAC TTC TCG CCC AGG CTG GGC   477
Pro Asp Pro Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Pro Arg Leu[Gly   159

CGC ACC ATG AGC TTT TCG CCC AGA CTG GGA AGG GAG CTT TCG TAC GAT TAC  CCT  531
Arg]Thr Met Ser Phe Ser Pro Arg Leu[Gly Arg]Glu Leu Ser Tyr Asp Tyr  Pro  177
         γ-SGNP
ACA AAA TAT AGG GTT GCC AGA AGC GTT AAC AAG ACA ATG GAC AAC TAA ACGAATTAT 588
Thr Lys Tyr Arg Val Ala Arg Ser Val Asn Lys Thr Met Asp Asn ***           192

GGTCCGCTTGAGGTACCTCATTTGAGGTCTCGATCGACTCCGACGAACGGTTACGGGTAAACGGCGACAATGT 649
TAATGTTTTGGACGAAACAATTGTTAATTAATAAATTCACGTGATTTTGGAATTGTAATTTATAAGTGAATAA 722
AAAAATAAACTATTTAAAATAAATGAGTCATTATTATTATTAAAAAAAAAAAAAA                   777
```

图 6-5 编码 Bom-PBAN 的 cDNA 序列及其推导的蛋白质序列

Kawano 等采用 RP-HPLC 分离家蚕咽下神经节中的肽类，通过比较与人工合成肽的保留时间或直接采用质谱分析等方法，证实了 α、β、γ-SGNP 的存在。

## 4 结构和活性关系

Saito 等（1994）合成一系列缺失 N 末端的、不同链长的 DH 分子进行了生物活性测定。他们制订了两种指标分析活性：①诱导 50%卵滞育的剂量（ED50）；②不考虑剂量的情况下，能诱导卵滞育的最大比例。结果表明，C 末端 6 肽酰胺能诱导与完整 DH 分子相同的滞育强度，但其 ED50 值要比后者高 1 000 倍。从 C 末端（编号 1）到 N 末端（编号 24）依次增加氨基酸残基数，ED50 在第 9 与 10、23 与 24 之间急剧下降，说明 Arg-10 和 N 末端 Thr-24 对降低 ED50 起重要作用。因此认为 DH 的 C 末端酰胺化序列是 DH 的核心结构，中间和 N 末端区作为补充结构，Arg-10 和 Thr-24 对补充结构发挥功能、Trp-6 对核心结构发挥功能起关键作用。

由于 DH 的 cDNA 产物均具有 FXPRLamide 保守序列，其中滞育激素 DH 可诱导家蚕的胚胎滞育（Sato et al，1993）。同样，Bom-PBAN Ⅰ、β、γ-SGNP 对家蚕的胚胎滞育也有一定的诱导作用，但活性要小得多，DH、Bom-PBAN Ⅰ、β 和 γ-SGNP 的诱导阈值分别为 1、130、500 和 1 050pmol/虫。这表明 DH 序列对诱导家蚕卵滞育的重要性。

## 5 基因及其表达

### 5.1 DH 基因

用 DH 前体蛋白的 cDNA 作探针，从家蚕基因组文库中分离到 DH 基因。测序表明，此基因由 5 个内含子和 6 个外显子组成。DH 由第 1 和第 2 两个外显子编码，第 4 外显子还编码 2 个 SGNP，第 5 外显子上还有 1 个 SGNP 的编码序列（Xu et al，1995）。以上结果表明，家蚕 DH 基因与美洲棉铃虫 PBAN 基因非常相似。说明了这一基因的保守性。此外，从基因组 Southern 杂交分析推定滞育激素基因为单拷贝。在非滞育品系和多化性品系中都有此基因存在（徐卫华，1995）。

### 5.2 基因表达部位及细胞

Northern 杂交分析发现，DH 仅在咽下神经节中表达，这进一步证实咽下神经节是 DH 合成的唯一器官（Sato et al，1994）。体外系统中，DH mRNA 翻译成一分子质量约为 $20\times10^3$u 的多肽，这与数个神经肽均从同一前体蛋白加工而来的推测相符。

用地高辛（Digoxigenin）标记的 cDNA 探针进行原位杂交，可清楚地观察到咽下神经节中有 12 个分泌细胞。这些细胞分成 3 簇，分别位于上颚（2 对细胞）、下颚（3 对细胞）和下唇（1 对细胞）3 个神经原节上。这些细胞在滞育性的 5 龄幼虫、蛹及成虫咽下神经节中均能观察到，而在胸、腹神经节中无杂交信号（Sato et al，1994）。

Ichikawa 等（1995，1996）对这些分泌细胞作了进一步研究，发现它们有功能分化现象。当剪去含有前、中簇细胞的前半部而保留咽下神经节后半部时，DH 活性强，而 PBAN 活性很弱；相反，剪去含簇细胞的后半部而保留前半部时，DH 活性很弱，PBAN 活性却很强。这说明前、中簇细胞负责 PBAN 活性，而 DH 活性主要来源于后簇细胞。用钨针去除 3 簇细胞中的 1 簇或 2 簇，结果支持以上结论，并进一步指出 PBAN 活性主

要来源于中簇细胞，前簇细胞贡献较小。此结果与 Fukuda 和 Takeuchi（1967）的一致，他们认为，位于咽下神经节中部腹面的 1 对细胞是 DH 的来源。因为蛹早期除去此对细胞时，雌蛾产非滞育卵。他们所指的这 1 对细胞很可能就是位于下唇神经原节中的后簇细胞。

原位 Northern 杂交分析表明，后簇细胞有信号时，前、中簇细胞也显示相似强度的信号，说明 3 簇细胞同时转录了前体 mRNA。为什么后簇细胞能显示 DH 活性而前、中簇细胞不能？是在翻译水平还是在翻译后加工或分泌释放水平形成的差异？哺乳动物同一前体蛋白在垂体不同部位可以加工成不同激素（Mizuno et al，1994），这为 DH 前体不同加工形式的可能性提供了间接的实例。此外，在大量产生 PBAN 的成虫期，咽下神经节抽提物的 DH 活性低（Sonobe et al，1977）。从成虫中提取到的两种 DH 的分子质量分别为 3 300u 和 2 000u，显然与从蛹咽下神经节中分离到的 24 肽 DH 分子量不符，这是 DH 前体蛋白不同加工形式所致。

### 5.3 DH 基因表达的调控

DH 是诱导子代胚胎滞育的激素。为了诱导滞育，DH 必须在特定时期大量表达。同时，这种表达受胚胎期环境信号的调控。因此，DH 基因的表达受发育程序和环境信号的双重控制。用定量反转录-多聚酶链反应（RT-PCR）方法，测定了卵和咽下神经节中 DH mRNA 量的动态（Xu et al，1995）。结果表明，15℃孵育的卵，仅在蛹后期出现 1 个与产生 PBAN 活性有关的 mRNA 峰；在 25℃孵育的卵，从胚胎期至成虫期共出现 5 个 mRNA 峰。从而证实了高温（自然环境下与长日照相伴）对胚胎滞育的诱导作用。

## 6 作用机理

咽下神经节对滞育的诱导作用受脑的控制（Morohoshi et al，1969）。脑中有促进和抑制 DH 释放的部位（Matsutani et al，1987），抑制性神经递质 γ-氨基丁酸的释放抑制细胞分泌 DH，脑中的信号通过围咽神经索传递（Shimizu et al，1989；Hasegawa et al，1990）。

注射天然 DH（Kai et al，1981）或人工合成 DH（Ikeda et al，1993）均能诱导子代卵滞育，注射抗 DH 血清能颉颃 DH 功能而使后代卵不进行滞育（Shiomi et al，1994）。这些实验确证 DH 对滞育的诱导作用。

刚产下的滞育卵糖元含量比非滞育卵高约 25%，这是滞育诱导的一个重要特征。滞育性卵中糖元是从母体血淋巴中海藻糖转化而来，而海藻糖又由脂肪体释放（Chino，1958；Yaginuma et al，1978）。海藻糖由 2 分子葡萄糖以 α-1，1-糖苷键结合而成，由它合成糖元必先经水解成单糖。海藻糖酶（Trelalase）是唯一能水解此糖的酶。注射 DH 并不引起血淋巴中海藻糖增加。表明 DH 并不是通过刺激脂肪体增加海藻糖的释放量。因而推测卵巢中糖元的增加可能涉及海藻糖酶活性的增加。Yamashita 等（1972）和 Miyadai 等（1980）进行的活体实验不仅证实上述推测，而且鉴定出此酶正是脂肪体糖元转化为卵巢糖元途径中的关键酶，它控制卵巢合成糖元的底物输入量。

Ikeda 等（1993）通过体外实验，观察到 DH 直接对卵巢海藻糖酶活性的刺激作用。

他们从摘除咽下神经节的蛹中解剖卵巢进行离体培养，并在不同时间加入DH，结果不加DH的对照卵巢酶活性始终保持在0.6μmol/min.g的水平。处理样中，DH加入1h后，就发现酶活性上升；6h后，上升到1.4μmol/min.g的水平。

Su等（1994）进一步研究了DH对海藻糖酶活性的调控水平。他们采用RT-PCR方法测定施用DH的去咽下神经节蛹中海藻糖酶mRNA的动态。结果表明，注射DH后1～4h，卵巢中mRNA量直线上升，比对照增加5倍。用同样的方法测定马氏管、消化道等器官对注射DH的反应，这些器官中海藻糖mRNA量变化不明显。此结果证实DH靶器官是卵巢的结论。

在体外系统中加入放线菌素D或放线菌酮等转录或翻译抑制剂，结果表明，DH增加海藻糖酶活性，主要通过增加新mRNA转录和酶蛋白合成，而不是抑制mRNA的降解(Su et al，1994)。

DH在卵巢中的作用涉及钙离子。去除体外系统中的钙离子，完全抑制DH对海藻糖酶活性的刺激。加入依赖钙离子的蛋白激酶的抑制剂，明显降低海藻糖酶的活性。这暗示DH对卵巢的作用可能通过一种钙离子依赖激酶催化的反应而实现。

除诱导卵中积累较多的糖元外，DH还促进3-羟犬尿氨酸从血淋巴向卵巢输送，并在卵中积累（Sonobe et al，1970；Kubota，1979），成为以后确定卵色的前体。

DH诱导的结果是在卵中积累了较多糖元和3-羟犬尿氨酸。此外，卵中还应具有经DH诱导而产生的其他物质或信息，以便能在产后不久发动滞育。

## 第八节 蜕壳激素和蜕皮激发激素

蜕壳激素（eclosion hormones EH）是在每龄末期引起昆虫蜕皮行为并控制有关生理变化的神经肽。

### 1 蜕壳激素

#### 1.1 化学组成

1987年，Kono等测定了家蚕EH的氨基酸序列。家蚕的EH由4种不同神经肽组成，图6-6中所示为Bom-EH-Ⅱ，Bom-EH-Ⅰ和Bom-EH-Ⅲ在N-末端缺少第1、2位的两个氨基酸，而Bom-EH-Ⅲ和Bom-EH-Ⅳ缺少第23位的赖氨酸。

同一年，Kataoka等和Marti等各自独立测定了烟草天蛾EH的氨基酸序列。称为Mas-EH。此外，他们也发现了在N-末端缺少了两个氨基酸残基的神经肽。

进一步的研究表明，含有62个氨基酸残基的Bom-EH-Ⅱ和Mas-EH才是完整的EH，其他均是它们脱去个别氨基酸后的异形物，Bom-EH-Ⅱ和Mas-EH有80%的氨基酸相同。图6-6中所示的EH是通过烷基化还原去除双硫键后变成的烷基化线性衍生物。

Kono等（1990）的测定结果表明，截去N-末端的6个氨基酸，不影响家蚕EH的活性，同样，截去C-末端的1个氨基酸对EH活性表达也无影响。但截去C-末端的5个氨基酸残基，活性大幅度下降。这表明C链末端对EH活性的表达非常重要。

家蚕 EH Ⅱ （Bom-EH-Ⅱ）：

H-SPAIASSYDAMEICIENCAQCKKMFGPWFEGSLCAESCIKARGKDIPECESFASISPFLNKL-OH

烟草天蛾 EH （Mas-EH）：

H-NPAIATGYDPMEICIENCAQCKKMLGAWFEGPLCAESCIKFKGKLIPECEDFASIAPFLNKL-OH

图 6-6 家蚕和烟草天蛾蜕壳激素的氨基酸序列

## 1.2 生物学活性

柞蚕（*Antheraea pernyi*）总是在特定的时段内羽化，这种节律具有种的特异性。若破坏或移除柞蚕的脑，羽化便失去了这种节律。无脑柞蚕的羽化节律可通过置入另 1 个脑而恢复。但此时的柞蚕羽化时间则由置入脑的昆虫种类决定。这表明昆虫脑中具有控制羽化时间的时钟，决定着具有种特异性的羽化时间。与此不同的是，羽化行为由无脑柞蚕本身决定，而与置入的脑的种类无关。这表明羽化行为的程序存在于柞蚕腹部的中枢神经系统中。柞蚕预成虫分离腹部的羽化行为可被预成虫的脑—心侧体复合体所激发。这是由于此复合体中含有 EH，EH 在蛹的最后 1d 释放至血淋巴中。可见，脑内时钟指导 EH 从脑—心侧体复合体中释放至血淋巴，EH 到达腹部后启动具有种特异性的蜕皮行为。

在烟草天蛾中，EH 可启动幼虫、预蛹和预成虫的蜕皮。但启动阈值不同。启动幼虫和预蛹蜕皮时所需的量比启动羽化小得多。

EH 除启动蜕皮外，还具有多方面的功能。在蜕皮时它可以作用于多种多样的神经靶标和非神经靶标。在烟草天蛾中，EH 的功能主要有：①激活蛹特有的 gin-trap 反射；②启动特有机制增加预成虫翅的可延展性；③控制鞣化激素 bursicon 的释放；④刺激 Verson's 腺的分泌；⑤直接或间接刺激表气管腺分泌 ETH。在柞蚕中，EH 可启动成虫特有行为，羽化时激发腹部节间肌肉的程序化死亡。

## 1.3 分子生物学

采用专一性的寡核苷酸探针筛选 cDNA 文库，已分离出烟草天蛾和家蚕 EH 的 cDNA 克隆，由 cDNA 序列推导的 EH 与分离鉴定的结果完全相同。

烟草天蛾的 EH 基因也已分离鉴定（Horodyski et al，1989）。EH 基因在单倍体基因组中是单拷贝。通过比较 cDNA 与染色体 DNA 序列可知，EH 基因由 3 个外显子组成。第一外显子不转译，第二、三外显子编码 88 氨基酸的 EH 前体。除具有 EH 的全部氨基酸编码外，在 EH 肽链前面还有一段疏水性信号肽。

EH 在昆虫体内含量极微，纯化和测定结构序列须用大量材料，对小昆虫是不可能的。在昆虫中 EH 有广泛的交叉反应，说明在结构上的保守性。因此，可利用 1 种昆虫的 EH 基因去分离其他昆虫的 EH。如用烟草天蛾 EH 基因为探针已从果蝇基因库中分离出果蝇 EH 基因编码 C 末端的部分。果蝇 EH 的 C 末端的氨基酸序列和烟草天蛾 EH 的相应部分约有 70% 相同（Truman et al，1990）。

在此基础上，Horodyski 等（1993）的进一步试验分离出了黄猩猩果蝇的 EH 基因和

cDNA，推导出了黄猩猩果蝇 EH 的全部结构。比较推导出的氨基酸序列表明，黄猩猩果蝇的 EH 与烟草天蛾和家蚕的 EH 差异很大，全长有 73 个氨基酸。但在肽链第 9 位有 1 个潜在的内切蛋白酶解位点，若在翻译后加工时从此处切开，则黄猩猩果蝇 EH 也有 62 个氨基酸。这一具有 62 个氨基酸的黄猩猩果蝇 EH 与烟草天蛾的 EH 同源率为 58%，与家蚕的 EH 同源率为 48%。但 6 个半胱氨酸的位置在 3 种昆虫的 EH 中均相同，表明了 EH 二级结构的保守性。他们进一步研究了黄猩猩果蝇 EH 在染色体中的位置，结果表明，此基因位于染色体 3 右臂 90B1 和 2 之间。

EH 是较大的肽分子，并在一定位置有 3 个双硫键，用常规技术合成比较困难。有了 EH 基因，可在适当的表达系统（如杆状病毒）中合成 EH，用以进行结构分析、生理学研究、受体分离等。最近，用化学方法合成的家蚕 EH 基因，在大肠杆菌中表达，产生有生物活性的 EH。将所得的 EH 纯化后，确定了 3 个双硫键的位置，并证明 C 末端的 4 个残基对 EH 活性起重要作用（Kono et al，1990）。重组的家蚕 EH 基因也首次在酵母系统中成功地表达，而且产率较高，纯化步骤简易。纯化后的 EH 具有与从家蚕脑中纯化的天然 EH 相同的生物活性（Hayashi et al，1990）。所有这些，都为 EH 的深入研究奠定了坚实的基础。

### 1.4　分泌细胞

用 Northern 杂交和原位杂交的方法测定了烟草天蛾、家蚕和黄猩猩果蝇 EH 的表达，结果表明，它们的基因全部是单拷贝的，mRNA 存在于脑内特定的分泌细胞中。在烟草天蛾和家蚕中，位于脑中部腹面的两对 V 型神经分泌细胞（VM 细胞）是 EH 基因的表达场所，EH 的 mRNA 只存在于这两对 VM 细胞中。在黄猩猩果蝇中，EH 基因的表达在脑内一对特定的神经分泌细胞中。这一对细胞可能与鳞翅目昆虫的 VM 细胞同源，轴突具有 2 分支，其中 1 分支沿中枢神经系统延伸至腹末，另 1 分支则延伸至环腺的心侧体中。

研究表明，VM 细胞的轴突沿着中枢神经系统同侧向后延伸，直达腹末神经节。从腹末神经节伸出后终止于直肠神经，并在终止处形成大量膨大结构。这些结构可能与 EH 的释放有关。在脑内，VM 细胞轴突具有位于同侧的两个细小分支。在昆虫变态时，VM细胞形成 1 个新的脑内分支，这 1 对分支延伸至同侧的心侧体神经（NCC 1＋2）并内延到心侧体，甚至有少量神经纤维穿过心侧体而到达咽侧体，另一些则穿过心侧体后与逆走神经汇合。VM 细胞在变态时形成的这一新的脑内分支在预成虫时更为发达。

### 1.5　释放机制

EH 在昆虫的整个发育过程中均聚积于脑内 VM 细胞和中枢神经系统 VM 细胞轴突中，但只有在每次蜕皮时，EH 才释放到血淋巴中和中枢神经系统的部分区域。显然存在一定的调控因素，控制着 EH 在昆虫的特定发育时间释放，完成蜕皮过程。

研究表明，EH 的释放由每次蜕皮时蜕皮激素的降低而激发。注射蜕皮酮进入蜕皮前期的昆虫，在延缓昆虫蜕皮的同时，VM 细胞内 EH 的释放速度也随之降低。显然，蜕皮酮下降、EH 释放和 EH 靶标敏感性的提高同时出现是保证正常蜕皮所必需的。

EH 的释放位点随虫态而异。在幼虫和预蛹蜕皮时，EH 通过中枢神经系统释放到血

淋巴中，而在预成虫阶段蜕皮时，EH则通过心侧体释放。这与VM细胞分支的形成及其在变态时的变化相一致。

### 1.6 作用方式

将cGMP注入用茶碱（磷酸二酯酶抑制剂）预处理的烟草天蛾腹部可引发烟草天蛾的蜕皮行为，表明EH对神经和周缘靶标的作用涉及cGMP。

EH引起cGMP的提高在不同的昆虫中途径不同。Marton等（1992）对烟草天蛾腹神经索的研究结果表明，EH通过刺激细胞内花生四烯酸的释放和代谢而提高细胞内cGMP。而Shibanaka等（1993，1994）对家蚕的研究结果却表明，EH刺激靶标细胞内的肌醇三磷酸提高，肌醇三磷酸引起钙离子库释放大量的钙离子，后者激活氧化氮合酶产生大量氧化氮，再由氧化氮激活鸟苷酸环化酶合成cGMP。

在烟草天蛾中，腹神经索细胞内具有两种$54\times10^3$u的蛋白质，称为蜕壳激素环鸟苷酸调控磷蛋白（EGPs）。这两种蛋白质在EH的激活下磷酸化。在预蛹期的体外试验中，这两种蛋白质的磷酸化程度与预蛹对EH的敏感性密切相关。表明这两种蛋白质的磷酸化是EH作用于靶标细胞的最后一个环节。

从以上试验结果可知，EH作用于靶标细胞后，引起细胞内cGMP的提高，后者再刺激EGPs的磷酸化，从而激活靶标细胞，产生蜕皮反应。

除引发蜕皮作用外，蜕壳激素还引起运动神经的变化而促使蚕蛾科成虫羽化期的腹部节间肌退化。

### 1.7 其他昆虫的蜕壳激素

鳞翅目昆虫中，除了烟草天蛾和家蚕外，Schnee等（1984）发现舞毒蛾中枢神经系统和血淋巴中均具有EH活性。这些粗提品不仅能激发舞毒蛾预成虫的蜕壳，而且能促使烟草天蛾翅的延展。此外，Kataoka等（1987）证实了烟芽夜蛾，Eldridge等（1992）证实了草地贪夜蛾对烟草天蛾EH的活性。

Fraenket等（1984）把即将羽化的麻蝇（*S.bullata*）血淋巴注射到同种麻蝇预成虫的体内，可以明显加速后者的羽化。但这种激素的性质以及与EH的关系，仍未见报道。研究表明，在麻蝇*S.bullata*中，背前胸蜕壳肌（DAEMs）初步降解及收缩功能的丧失，分别与蜕壳前1h和蜕壳过程中头释放的1个信号有关，若提前扎颈阻止这一信号释放至胸部，DAEMs便不被降解。推测这一信号即为*S.bullata*的EH。

通过分离EH的基因，证实EH基因的表达，应用烟草天蛾EH抗体识别出表达细胞等方法，已成功证明了EH在黄猩猩果蝇中的存在。黄猩猩果蝇EH存在于脑内1对特定的细胞中。在羽化前，这对细胞中的免疫染色反应明显下降，这可能由EH释放引起，从而支持了EH对蜕壳的激发作用。预成虫头部和漫游期幼虫中枢神经系统抽提物可明显促进烟草天蛾幼虫的蜕皮，证实了黄猩猩果蝇EH的活性。当以黄猩猩果蝇本身为试虫时，既未发现其EH的促蜕壳活性，也未证实其促肌肉降解的活性，这可能是使用的生测方法不够灵敏。此外，至今为止仍未发现EH基因缺失的果蝇品系。因此，黄猩猩果蝇EH对本身的生理作用仍难确定。

使用烟草天蛾为试虫，通过观察不同来源的神经系统抽提液对预成虫蜕壳的影响，已经鉴定出直翅目、半翅目、鞘翅目、毛翅目和双翅目的幼期昆虫中均存在 EH 类似物，这证实了 EH 存在的广泛性。

Horodyski 等（1993）采用分子生物学的方法，根据烟草天蛾、家蚕和果蝇 EH 已知序列设计出简并引物，应用 PCR 扩增技术，以染色体组 DNA 或 cDNA 为模板，从多种昆虫中扩增出了 EH 基因片段。从这些片段中推导出了对应于烟草天蛾和家蚕 EH 的 22～48 位的氨基酸残基（EH 核心片段）。推导出的 10 种昆虫（包括不完全变态和完全变态类）的对应肽段与烟草天蛾 EH 相同肽段的同源率从 59%～93%（图 6-7）。这一核心区域中有 11 个氨基酸（包括两个半胱氨酸）在测定的 10 种昆虫中完全保守。埃及伊蚊和黄粉虫 EH 基因的这段核苷酸序列从染色体 DNA 和 cDNA 中均已扩增出，表明这两个种中编码这段肽的基因是表达的。

```
Manduca sexta              K K M L G A W F E G P L C A E S C I K F K G K L I P E
Heliothis subflexa         - - - - - - - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - D
Bombyx mori                - - - F - P - - - - S - - - - - - - - A R - - D - - -
Drosophila melanogaster    - T - - - D Y - Q - Q T - - L - - L - - - - - A - - D
Tenebrio molitor           - - - F - P Y - - - Q - - - D A - V - - - - - I - - D
Thermodia domestica        - - - F - P Y - - - Q - - - D A - V - - - - - I -
Pteronarcys dorsata          - - F - P Y - - - Q - - - D A - V - - - - - I -
Aedes aegypti              - R - Y - T F - D - Q - - - - A - L E - - - - I - - D
Locusta migratoria         - - - Y - P Y - - - Q - - - D A - L - - G - - M M - D
Acheta domesticus            - - F - P Y - - - Q - - - D - - V - - - - - - V
```

图 6-7　几种昆虫 EH 22～48 位氨基酸导出序列与烟草天蛾和家蚕的同源性比较

## 2　蜕皮激发激素

在蛾类中，由脑合成并经心侧体分泌的蜕皮激素（EH）启动蜕皮时的生化和生理学变化，这些变化在蜕皮时达到最大。昆虫在蜕皮时，总是表现出一系列具有种特异性的蜕皮前行为和蜕皮行为。这些行为程序存在于中枢神经系统中，激发这些行为程序的内分泌信号在烟草天蛾中已经证实，为蜕皮激发激素（ETH）。

### 2.1　细胞定位

Zitnan 等（1996）对蜕皮前后的烟草天蛾进行免疫组织化学染色时发现，在烟草天蛾的幼虫、蛹和成虫中几乎每体节均存在成对的内分泌腺—表气管腺（epitracheal glands EGs）。这些 EGs 共有 9 对，分布于前胸和腹部 1～8 节。各体节的 EGs 无论大小和形状均有变化。它们位于气门附近，附生在气门气管分叉处的内侧表面。EGs 最显著的部分是具有 1 个白色的 Inka 细胞。这个细胞在接近蜕皮时体积膨大，不透明，直径可达到 250μm。用 4，6-二氨基-2-苯基吲哚组织化学染色和用辣根过氧化酶和软体动物小分子心动肽 B（small cardioactive peptide B）的抗体免疫组织化学染色表明，除了 1 个 Inka 细胞外，每个 EG 至少还具有 2～3 个功能未知的小型腺体细胞。在多数情况下，所有腺体细胞成为 1

束，但偶而也可见 Inka 细胞与其他腺体细胞分开。预成虫期时，小型腺体细胞在变态过程中消失，只剩下了单独的 Inko 细胞。每次蜕皮之后，Inka 细胞体积变小，褪去白色，此时对软体动物小分子心动肽 B 抗体的免疫反应也消失。这些结果表明 Inka 细胞内的分泌物在蜕皮过程中释放。

为了测定 Inka 细胞在蜕皮过程中的作用，Zitnan 等（1996）用生理盐水抽提 EGs，用加热和离心去除蛋白质的方法分离出粗肽液，注入将要蜕皮的幼虫、预蛹和预成虫中，EGs 抽提物在注射后 2～10min 内便能激发处理对象蜕皮。根据这一功能，研究者将这个肽命名为烟草天蛾蜕皮激发激素，即 Mas-ETH。

## 2.2 化学结构

Zitnan 等（1996）用酸化甲醇（甲醇:水:乙酸＝90:9:1）匀浆新鲜烟草天蛾的 EGs，离心后保留上清液，蒸发溶剂后的粗酶制品，经 Microsorb C4 反相液谱（RPLC）分离后，得到 1 种纯度达 95% 的肽，生测结果表明，这就是 Mas-ETH，用液体次级离子质谱（LSIMS）分析表明，Mas-ETH 分子量为 2 940.5u±0.1u，Edman 自动降解测序仪的测序结果表明，这是一个具有 26 个氨基酸的多肽（图 6-8）。

```
                                               10
Ser-Asn-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Phe-Asp-Gln-Gly-Met-Met-Gly-Tyr-Val-Ile-Lys-Thr
20
Asn-Lys-Asn-Ile-Pro-Arg-Met-amide
```

图 6-8 烟草天蛾的蜕皮激发激素的氨基酸序列

C-末端酰胺化虽已由 Mas-ETH 的分子量所表明（酰胺化 Mas-ETH 计算分子量为 2 940.44u），但 Zitnan 等（1996）还是通过化学方法进行了验证，合成的 Mas-ETH 分子量为 2 940.4u±0.1u，与天然肽分子量非常符合。通过 RPLC 的氨基酸定量分析，估计预蛹期的每个 Inka 细胞中在蜕皮前 3～4h 达 10pmol。由于每个预蛹中具有 18 个 Inka 细胞，因此每个预蛹中具有 180pmol 的 Mas-ETH。如果预蛹中血淋巴体积为 1ml，则Mas-ETH 的生理浓度为 180nmol/L。

C-末端的 3 个氨基酸序列为 PRMamide，与小分子心动肽 B 的完全相同。这可能是小分子心动肽 B 抗体在 Inka 细胞中有免疫反应的原因。Mas-ETH 在 EG 腺中可能仅由Inka 细胞产生，这是因为：①小分子心动肽 B 抗体反应仅限于 Inka 细胞中；②在预成虫中，EG 腺中其他腺体细胞解体，只剩下了 Inka 细胞，但仍具有 Mas-ETH 活性。

## 2.3 生理功能

Zitnan 等（1996）的测定表明，5 龄幼虫将要蜕皮时或预蛹时血淋巴中具有 Mas-ETH 活性。在蜕皮前行为表达时收集血淋巴并用 RPLC 分离，分离成分用电喷射质谱仪测定分子量为 2 945u±2u，与 Mas-ETH 非常相似。但在幼虫蜕皮前 8h，蛹蜕皮前 3.5h，没有测到 Mas-ETH 活性，这表明 Mas-ETH 只有在激发蜕皮的时候才适时分泌于血淋巴中。

自然状况下，烟草天蛾 5 龄幼虫具有典型的蜕皮前行为，即欲蜕皮时胸节和腹节出现节律性的背腹收缩。收缩形成的皱折先出现于后部的背侧面，随后向前扩展，蜕皮前行为

持续 60～80min，接着是蜕皮行为，持续约 10min。蜕皮行为则以展现蠕动的收缩波为特征。这种收缩波也是先出现于后部，并向前扩展。Zitnan 等（1996）使用转导器测定体内压力变化，将 5 龄幼虫和预蛹的蜕皮前行为和蜕皮行为体内压力变化定量化。5 龄幼虫蜕皮前节律性的背腹收缩每隔 10～12s 从尾至头进行 1 次，每次持续时间 5s 左右。若将 50pmol 的 Mas-ETH 注入还需 8h 才展现蜕皮前行为的 5 龄幼虫，注射后 2～10min，后者即展现蜕皮前行为，收缩波型与正常展现蜕皮前行为的 5 龄幼虫完全一致。蜕皮行为由后向前蠕动的收缩波每 20s 一次，在正常 5 龄幼虫蜕皮前行为开始后 1h 左右出现，在 Mas-ETH 诱导蜕皮前行为开始后 35～50min 开始。同样，Mas-ETH 也能诱导预蛹的蜕皮前和蜕皮行为。

将 Mas-ETH 注射到还需 36h 蜕皮的 5 龄幼虫体内，6～10min 后展现蜕皮前行为，但不展现蜕皮行为。若在出现头壳缝时注射 Mas-ETH（5 龄幼虫蜕皮前 34h），幼虫展现蜕皮前行为和蜕皮行为。在正常蜕皮前 10～34h 注射 Mas-ETH 到 5 龄幼虫体内，5 龄幼虫展现蜕皮行为 10～45min，但蜕皮不能正常进行。若在蜕皮前 6～10h 注射 Mas-ETH 到 5 龄幼虫体内，蜕皮行为可持续近 2h，甚至能蜕去部分表皮。Mas-ETH 只有当旧表皮完全溶离后（大约离正常蜕皮 6h），才能激发成功的蜕皮。

Mas-ETH 也能激发预蛹和预成虫蜕皮。预蛹在正常蜕皮前 48h，便可对 400pmol 的 Mas-ETH 反应。虽然在此时预蛹的蜕皮前行为很难觉察，但转导器测定表明，注入 Mas-ETH 数分钟后，血淋巴压力便呈现节律性的变化，50～90min 后开始蜕皮。预成虫在正常羽化前 24h，便能对 1～2nmol 的 Mas-ETH 反应。腹部的环绕运动在注入后 3～10min 开始，接着相对静止，2～3h 后成虫出壳。

## 2.4 与蜕壳激素的关系

烟草天蛾对 Mas-ETH 反应的敏感性发生较早（蜕皮前 1～2d）。相反，对 EH 的敏感性发生却较晚。正常蜕皮前 6～12h，将 EH 注入蜕皮前幼虫中仅使蜕皮前幼虫展现蜕皮前行为。只有在正常蜕皮前 6h 注射 EH，才激发幼虫蜕皮前和蜕皮行为。如果 EH 在敏感期开始后注射，从注射到激发行为反应需 3h 左右。在预蛹时，正常蜕皮前约 8h 注射 EH 才会激发行为反应，反应滞后 140min。预成虫则仅在正常羽化前 4h 接受了 EH，才引起蜕皮反应。Zitnan 等的结果显示在所有的虫期，ETH 激发的行为反应都远早于 EH，而且，Mas-ETH 引起反应的滞后时间也很短，只有 2～10min。可见，Mas-ETH 才是蜕皮前行为和蜕皮行为的直接激发者，而 EH，则可能是刺激 EGs 释放 Mas-ETH

为了验证上述假设，将 Mas-ETH 用于离体中枢神经系统，引发后者电脉冲暴排，这些暴排显然与蜕皮前和蜕皮行为有关。解剖出腹端神经段（A5、A6 和 A7），移除全部气管，用吸收电极记录电脉冲暴排，结果显示，5 龄幼虫正常蜕皮时的蜕皮前行为电脉冲与 100nmol/L 的 Mas-ETH 诱导的非常相似。在 5 龄幼虫正常蜕皮时，无论活体测定还是离体诱导，腹神经索电脉冲暴排均每隔 10～12s 一次，每次持续 5～10s。类似地，控制幼虫蜕皮行为的电脉冲在活体测定与离体情况下与 1$\mu$MOL/L 的 Mas-ETH 诱导的非常相似，电脉冲暴排间隔 20～30s，每次持续 20s。激发蜕皮前电脉冲暴排的 Mas－ETH 最适浓度低于激发蜕皮电脉冲暴排的，激发预蛹蜕皮暴排的浓度更高达 1～5$\mu$MOL/L。这表明在

EGs中应有其他ETH类似物与ETH一起协同作用，这一点已由Zitnan等在用RPLC分离Mas-ETH时证实。

Weeks等（1984）和Truman等（1978）的研究结果表明，EH（即成虫心侧体抽提物）只有在气管系统存在，尤其是气门气管完整时才能激发离体神经索的电脉冲暴排。由于EGs附生于每节气门附近的气管外壁，故EH的活性表现要求气管的存在可能是需要EGs存在。Zitnan的试验结果也证实，心侧体抽提物在气管系统不存在时，对离体神经索无效，而在刚解剖的预蛹期EGs存在时可刺激离体神经索暴排蜕皮前或蜕皮电脉冲。

以上结果表明，Mas-ETH直接激发神经系统，引发蜕皮前和蜕皮所需的电脉冲暴排，即打开了中枢神经系统中蜕皮前和蜕皮行为的程序。而EH的作用靶标可能是EGs，直接或间接地刺激Mas-ETH的释放。

### 2.5 其他昆虫的蜕皮激发激素

Zitnan等（1989）用蜡螟（*Gelleria mellonella*）作为试虫，使用FRMFamide抗体对蜡螟组织进行免疫组织化学染色，观察FRMFamide类似肽在组织中的分布，发现蜡螟幼虫、蛹和成虫蜕皮前，在每节气门的附近均具有1个大型的、染色很深的细胞，而在刚蜕皮的幼虫、蛹和成虫中却不具有这些巨大细胞，表明这些细胞的内含物在蜕皮过程中被释放，对控制蜕皮有一定的作用，但这些物质是否为ETH，仍需进一步的研究。

## 第九节 鞣化激素

蜕皮后，昆虫的新表皮常常是很柔软的，以便膨胀形成适当的形状（例如大部分昆虫的翅）。昆虫开始它的正常活动之前，表皮必须硬化，这是一个过程。在此过程中表皮蛋白之间发生交联。一般认为这种硬化作用可能是苯醌鞣化或β-骨化这两种机制中的一种机制发生的。苯醌鞣化的活性酶为表皮苯酚氧化酶，它将对苯二酚氧化为对苯醌，后者再与表皮蛋白的氨基发生反应，形成苯醌—蛋白质复合物。这一复合物再与别的苯醌反应而进一步氧化使几种蛋白质交联起来。对苯二酚通常是由真皮细胞产生的，分泌到昆虫表皮里的是N-乙酰多巴胺。由示踪试验表明，N-乙多巴胺在表皮硬化期进入表皮。特别是双翅目昆虫还可能利用β-丙氨酰酪氨的含酮衍生物，此物通过β-碳原子与表皮蛋白形成交联。

骨化作用通常是在激素控制下发生的，在较高等的双翅目中，蛹壳的形成是一个特殊的例子，这个过程显然是由于蜕皮素激活了多巴—蜕羧酶的基因而发生的。但Fraenkle曾指出，蛹壳鞣化的实际情况是在蜕皮素释放后，通过中枢神经系统的一种神经分泌因子来发动的。这种鞣化因子显然是通过cAMP发生作用，而cAMP还能加速吐茧幼虫的鞣化，但它是如何发动鞣化作用，目前仍不清楚。

### 1 发现

在大多数其他昆虫中，在蜕皮之后发生的表皮鞣化是由神经分泌细胞分泌的激素——鞣化激素（bursicon）激发的。20世纪60年代初，英国的Cottrell和美国的Fraenkel和Hsiao曾同时报道，丽蝇科成虫蜕皮后的鞣化需要一种血液携带因子。这种新羽化的蝇在

正常情况下必须由地下掘土而出，翅膀的伸张和鞣化要延迟几个小时，直到爬上地表才发生。新羽化蝇的颈部韧带用来防止胸和腹部的骨化，因而提供了一种生物测定鞣化激素活性的材料。鞣化蝇的血液中发现有鞣化激素，在脑的中部和连接胸腹部的神经节中也发现有鞣化激素。它主要是由胸腹神经节释放出来，这种激素显然是一种多肽，其分子量为 $40\times10^3$u，大多为（30～60）$\times10^3$u，已报道在很多不同品种的昆虫体内及不同的生活期中都有鞣化激素。

此后，又在双翅目蛹中发现一种蛹鞣化因子。这是一个在幼虫中合成的比鞣化激素分子量更大的（约 $300\times10^3$u）蛋白质。这种激素与昆虫表皮的鞣化和暗化过程有关。它能影响羽化后昆虫表皮的硬化，内表皮的沉积、水分挥发和气管的空化。鞣化激素现已在直翅目、半翅目、鞘翅目、鳞翅目、双翅目等昆虫中发现。是一类分布十分广泛的肽类激素。

## 2 合成部位

鞣化激素合成或释放部位依昆虫的种类而异。但在很多情况下发现合成这种激素的部位是在与腹面神经节链相联的围脏神经血液组织内。双翅目蛹的催鞣因子，是在幼虫神经节中合成。对其他昆虫的研究结果表明，脑和胸神经节是主要分泌部位。除此而外，美洲蜚蠊、非洲飞蝗腹末复合神经节也能分泌释放。它的合成和释放部位因虫种而异。但无种的特异性。

此外，鞣化激素作为神经调控物而分布在整个神经系统中，但主要集中在脑神经分泌细胞及心侧体，从许多昆虫的胸和腹神经节释放入血淋巴，蜕皮前或蜕皮过程中释放出来。

## 3 生物活性

鞣化激素与蜕皮激素不同。因为它诱导的硬化作用不受放线菌素的影响，也就是说，它没有激发从头合成一种酶分子的功能。它的主要功能是增高从酪氨酸合成相应苯醌衍生物过程中一种或多种酶的活性，从而导致表皮蛋白质的鞣化反应。

## 4 作用模式

很多种类昆虫在刚刚蜕皮后进行内表皮沉积过程中发生的新表皮的鞣化作用（tanning process），是在鞣化激素控制下进行的。控制蛹鞣化作用的激素称蛹鞣化因子，是在蜕皮激素的直接作用下，由昆虫中枢神经系统特别是脑合成的一种高分子量（$300\times10^3$u）的蛋白质，一旦合成就释放进入血淋巴，并使蛹表皮开始鞣化，随着鞣化结束，其滴度降低。

鞣化激素的作用机制还未完全阐明。对蜚蠊和粉蝶幼虫的研究表明，鞣化激素使酪氨酸对血细胞的渗透性增加。它也可能增加酪氨酸和（或）多巴胺对真皮的渗透性。然后，真皮细胞使多巴胺转变为 N-乙酰多巴胺并发生鞣化作用。cAMP 将引起丽蝇和蜚蠊颈韧带的后部变黑，因此，推测鞣化激素可能通过 cAMP 发生作用。真皮细胞内 cAMP 的刺激或鞣化激素对血细胞的刺激作用尚未弄清楚。蜕皮后，鞣化激素还刺激内表皮沉积，显

然是刺激了脂肪体所进行的表皮蛋白合成作用和（或）鞣化激素被吸收后促进了真皮中的蛋白质合成。

蛹鞣化因子的主要功能是提高从酪氨酸合成多巴胺过程的一种或多种酶的活性，从而导致蛋白质的鞣化，其作用属第二信使模式。在蛹鞣化过程中，蛹鞣化因子可能作用于皮细胞上腺苷酸环化酶，从而促发产生 cAMP，cAMP 再提高细胞对酪氨酸的通透性，并调节某些表皮鞣化剂和蛋白质的合成，导致蛹表皮鞣化。因此，认为蛹鞣化因子在酪氨酸转化为多巴胺的途径中有两个调节位点，一个通过 cAMP 的直接作用，另一个是通过对蛋白质合成或此途径中必需的活性蛋白质的刺激作用。

成虫鞣化激素对酪氨酸代谢的作用与蛹鞣化因子相似，并且在幼虫阶段也具有相似的功能。但其作用于血细胞而并非皮细胞。鞣化激素通过刺激 cAMP 的合成，cAMP 再激活蛋白质酶，依赖于 cAMP 的活化的蛋白激酶引起血细胞膜蛋白质磷酸化而通透性改变，促进酪氨酸进入血细胞，用于合成多巴胺。多巴胺由血细胞释放进入血淋巴再被皮细胞吸收，在皮细胞中产生鞣化剂 N-乙酰多巴胺，最后进入表皮参与表皮的鞣化作用。蜕皮后，鞣化激素刺激脂肪体蛋白质的合成和真皮中蛋白质的合成。

## 第十节　促性信息素生物合成神经肽

在已研究和鉴定了性信息素（SP）结构的 240 多种鳞翅目蛾类中，多数雌蛾依靠位于腹部第 8、9 节节间膜上的性信息素分泌腺（SPG）释放性信息素（SP）来吸引雄性个体，进行交配。这种性活动常具有昼夜节律。在粉纹夜蛾中，高滴度的 SP 一直存在于腺体中，但只有在晚上才被输送到腺体的表面而释放出来（Hunt et al，1990）。在美洲棉铃虫中，羽化当晚 SP 含量约为 50ng/雌，以后逐渐升高，第 3 晚达最高峰，约 120ng/雌，召唤活动也达最高峰，多数雌蛾的交配便发生在第 3 晚（Callahan，1958），以后随蛾龄增大而逐降。在第 3 晚，天黑后 1hSP 开始升高，召唤活动也同时出现，天黑后 4～6hSP 含量达最高峰，召唤活动也再剧烈，至天黑后 7h 两者同时下降（Raina et al，1986）。在荷兰石竹小卷蛾中，SP 含量在召唤前最大，而召唤行为的发生引起其滴度锐减（Webster et al，1982）。在舞毒蛾中，SP 滴度在白昼时达最大，恰好与它的交配期相遇（Giebultowicz et al，1992；Tang J D et al，1992）。可见，蛾类的性行为总是与 SP 生物合成和释放时期相偶，表明存在一种控制 SP 生物合成和释放的机制。这促使了大量昆虫学家、生物化学家和分子生物学家的研究，10 多年的努力基本阐明了蛾类对 SP 合成和释放的激素调控。

### 1　发现与组织定位

首先报道神经内分泌对 SP 释放控制的是 Riddiford 和 Williams（1971），他们研究惜古比天蚕蛾和多音柞蚕时发现，环境因子经脑处理后诱发雌蛾的召唤和 SP 的释放。脑信息传导刺激心侧体后，由后者释放一种激素，如摘去心侧体—咽侧体复合体或切断心侧体神经Ⅰ和Ⅱ，则具有召唤能力的蛾的比例大大降低。若将正展示召唤行为的多音柞蚕雌蛾的血液输入未召唤蛾，可诱发后者的召唤行为。去头的荷兰石竹小卷蛾 SP 量显著下降，这可能是由于缺少神经信号或神经激素的控制（Carde et al，1980）。Hollander 和 Yin

(1982) 对舞毒蛾的研究结果表明，包括脑在内的前段中枢神经与 SP 的释放密切相关。而咽侧体与 SP 的释放无关，切断腹末神经节前的神经索使 SP 的合成和分泌量大大降低 (Tang et al, 1987)。这些结果均表明由脑控制的一种神经信号或神经激素控制 SP 的合成和/或释放。

颈部结扎的美洲棉铃虫雌蛾不能产生 SP，而注射另一雌蛾的脑—咽下神经节复合体 (Br-SOG) 匀浆液可恢复 SP 的产生。分离的成虫脑和咽下神经节匀浆液在 1 虫当量/雌时分别引起 25%和 75%的扎颈雌蛾释放 SP，而分离的幼虫脑和咽下神经节匀浆液分别引起 0%和 100%扎颈雌蛾释放 SP，1 虫当量的蛾或幼虫的咽下神经节匀浆液的刺激活性分别为 140.3ng 或 35.7ng。高效气相色谱分析表明，这是分子质量为 4 200u 左右的化合物，能被羧肽酶 Y 和 TPCK 蛋白酶分解，表明该化合物是存在于咽下神经节的肽类，称为"促性信息素生物合成神经肽" (Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide, PBAN) (Raina et al, 1987)。Ma 等 (1996) 的生测结果表明，美洲棉铃虫的 Br-SOG 复合体和心侧体具有最大刺激活性，而其他神经节也有一定的活性。对 3 日龄雌、雄蛾的离体神经器官进行 ELISA 定量分析进一步证实了上述结果。Ma 等 (1994) 采用 Northern 杂交法，测定了美洲棉铃虫神经系统各部分中编码 PBAN 的 mRNA 含量，结果表明，阳性反应只存在于咽下神经节中，而心侧体、脑、咽侧体和腹神经索内均无反应，证实了 Hez-PBAN 的合成部位为咽下神经节。而其他部位的 PBAN 或其类似物均是运输所致。Ma 等 (1996) 采用 PBAN 抗血清进行免疫细胞化学分析，结果表明，在咽下神经节中存在 3 组免疫反应性 (PBAN-ir)，分别位于控制上颚、下颚和下唇的神经原节，上颚细胞群包含 4 个 PBAN-ir 细胞，位于咽下神经节前部，下颚细胞群则包含 8～10 个 PBAN-ir 细胞，形成咽下神经节中最明显的一群 PBAN-ir 细胞；下唇细胞群包含 4 个 PBAN-ir 细胞，其中 1 对很大，而另 1 对较小，故在横截面上较难发现。下唇的 PBAN-ir 细胞伸出轴突到心侧体和邻近动脉的 NCC-Ⅲ神经索，其他 2 组 PBAN-ir 细胞则将轴突伸向下颚神经和腹神经索。

同样，Sreng 等 (1990) 将组织匀浆液注入扎颈的欧洲玉米螟雌蛾，测定促 SP 生物合成作用，结果表明雌、雄蛾和幼虫 Br-SOG 均有显著的刺激活性。Ma 等 (1995) 的试验表明，欧洲玉米螟 3 日龄雌蛾 E-11-十四烯醇醋酸酯含量约 8.47ng/腺，去头后 SP 下降到检测不出的水平 (<0.3ng)，若注入 1 蛾当量的咽下神经节匀浆液或 4pmol 的 Hez-PBAN，可恢复去头雌蛾的 SP 合成水平 (分别达 10.84ng 和 9.15ng)，但注射脑、血液和生理盐水均不可恢复 SP 的合成能力。表明 PBAN 的存在部位为咽下神经节。解剖分离咽下神经节各部位分别生测和免疫细胞化学分析，进一步表明在咽下神经节中同样存在 3 组免疫反应性 PBAN-ir 细胞——SMd、SMx 和 SLb，所处部位与美洲棉铃虫相似。其中 SMd 包含 4 个 PBAN-ir 细胞，其轴突后伸与 SMx 轴突融合；SMx 由 8～10 个 PBAN-ir 细胞组成，这些细胞的轴突伸向后背方，与 SMd 轴突融合。融合后，轴突生出一侧突通向心侧体神经 3，主干侧伸后分为两支，通往下颚和沿腹神经索后延。后延轴突在每一腹神经节中形成大量端丛，终止于腹末神经节。SLb 由 2 个 PBAN-ir 细胞组成，其轴突通向心侧体神经 3 而在心侧体内形成大量端丛。相似的 PBAN-ir 细胞在烟草天蛾和甘蓝夜蛾、马得拉蜚蠊、美洲大蠊和一种双翅目昆虫中发现 (Tips et al, 1993)。Marco 等 (1996) 用

ELISA 法分析了 *S.littoralis* 中 PBAN-ir 存在部位。结果表明逆走神经系统、Br-SOG、腹末神经节中无论白昼还是黑夜均呈 PBAN-ir 阳性反应。Saito 等（1993）应用 Northern 杂交法分析了家蚕神经系统各部分中编码 Bom-PBAN 的 mRNA 的含量，结果参见 DH ·节。

Sreng 等（1990）用生理盐水分别抽提飞蝗脑、心侧体、咽侧体、咽下神经节、视叶、额神经节、胸部神经节和腹部神经节，注入扎颈欧洲玉米螟中，发现脑、心侧体、咽侧体、咽下神经节和胸部神经节抽提物具有明显的刺激活性。用甲醇液抽提具活性的5种神经组织分离的上清液发挥出甲醇后重新溶于生理盐水，注入测定，结果脑失去了刺激活性，咽侧体中活性最高。切断心侧体、咽侧体和咽下神经节的连接神经 NCA1 和 NCA2，无任何神经联系的咽侧体 8d 后仍表现出相似的刺激活性，而心侧体、咽下神经节活性下降，表明咽侧体为合成场所。咽侧体抽提物加热到 100℃ 5min 仍保持同样的刺激活性，但在 37℃ 下用蛋白酶水解 1h，活性则完全消失。表明在飞蝗中，这些类似物仍为肽类。

此后，昆虫学家们先后在 21 种蛾中（Raina A K，1993）和飞蝗、二点蟋蟀、美洲大蠊和德国小蠊中发现了 PBAN 或其类似物的促 SP 活性。研究范围涉及鳞翅目夜蛾科、毒蛾科、家蚕蛾科、卷叶蛾科，直翅目蝗科和蟋蟀科，蜚蠊目和双翅目等重要农、林、卫生和经济昆虫。

## 2 分离、纯化、分子克隆及生理功能

### 2.1 分离、纯化

1989 年，为了分离与纯化美洲棉铃虫 Br-SOG 复合体内的 PBAN，切下了 2 万个蛾头，用气相色谱 3 次纯化后，采用 Edman 降解序列分析仪同时结合质谱仪证实，得到 1 个分子质量为 3 900u，含有 33 个氨基酸的多肽，称为 Hez-PBAN（Raina et al，1989）。随后，Kitamura（1990）等从 60 万个家蚕头中纯化到两个活性肽，分别称为 Bom-PBAN Ⅰ 和 Bom-PBAN Ⅱ。其中 Bom-PBAN Ⅰ 也由 33 个氨基酸组成，79% 与 Hez-PBAN 同源，Bom-PBAN Ⅱ 则具有 34 个氨基酸，除了 N-端多 1 个 Arg 外，其他氨基酸与 Bom-PBAN Ⅰ 完全相同。Kitamura 等认为，前体分子在翻译后加工中的差异导致了不同的 Bom-PBAN 结构。此后，Matsumoto 等（1992）又从东方粘虫幼虫的头中分离纯化了 1 个具有 18 个氨基酸残基的多肽，称为 Pss-PT。此肽在家蚕体内具有很高的促 SP 合成活性。这 3 个肽的 C-端均酰胺化，且具有 5 个特定氨基酸序列。最近，从舞毒蛾 Br-SOG 中分离到 1 个分子量约为 3 500u 的对烟芽夜蛾有很高生物活性的多肽 Led-PBAN，氨基酸序列分析表明与 Hez-PBAN 和 Bom-PBAN 结构相似，含有 33 个氨基酸，与 Hez-PBAN 和 Bom-PBAN Ⅰ 分别具有 81.8% 和 66.7% 的同源率（Masler et al，1994）。

Bom-PBAN 和 Hez-PBAN 的 N-端序列与胰岛素样生长因子Ⅱ（IGF）有一定的同源性（Kitamura et al，1989）。这两个肽的 C-端的 5 个特定氨基酸序列与从飞蝗中分离出的促肌肽（Lom-MT-Ⅰ）相同（Nachman et al，1991；Schoofs et al，1990），4 个与从马得拉蜚蠊中分离的 Lem-PK（Holman et al，1986）相同，其中 Pss-PT 的 C-端的 5 个特定氨基酸

序列与 Lem-PK 完全一样。

## 2.2 分子克隆

Hez-PBAN 的基因最早由 Davis 等（1992）部分克隆和测定。对克隆出的基因部分测序表明，在 14 位氨基酸处有一 0.63kbp 的内含子将 PBAN 基因分为两段。PBAN 基因序列前是 1 个含有 10 个氨基酸的肽，具有 FSPRL 结构，其后紧跟着 Gly-Arg-Arg 加工位点，在 PBAN 序列之后也具有 Gly-Arg 加工位点，紧接此加工位点之后是 1 个 8 个氨基酸的肽。此肽也具有 PBAN 序列 C-端的 5 个特定氨基酸序列 FSPRL。

与此同时，Bom-PBAN 的 cDNA 的碱基全序列的克隆、测序由 Sato 等（1993）和 Kawano 等（1992）同时完成，研究结果参见 DH 一节。

比较 DavisSato 和 Kawano 的结果可知，两者存在着很大的差异：①编码 Hez-PBAN 的基因起始密码子为 GTG，而不像其他真核生物一样为 ATG。若将 GTG 翻译为 Val 而不作为起始密码子，则此基因可向上游延伸出 31 个氨基酸。这 31 个氨基酸中有两个含有保守序列 FXPRL 的肽类，分别对应家蚕的 α-SGNP 和 β-SGNP。可见，此项修改甚为合理。但作此变动之后，其上游再也找不到起始密码子。②可读框大小差异显著。去除内含子后，编码 Hez-PBAN 的基因仅编码 70 个氨基酸，远小于编码 Bom-PBAN 的基因。这表明 Davis 等（1992）克隆出的可能只是编码 Hez-PBAN 基因的一部分。Ma 等（1994）对 H.zea 脑-咽下神经节的 mRNA 的 Northern 杂交证实编码 Hez-PBAN 的mRNA全长 0.75kbp，远大于已分离出的编码 Hez-PBAN 基因的可读框，从而证实了上述推想。

由于上述原因，Ma 等（1994）重新对编码 Hez-PBAN 的 cDNA 进行了克隆（图 6-9）。结果表明 cDNA 的最大可读框编码 194 个氨基酸。5'-端起始密码子开始至 Leu-20 为一疏水性真核生物信号肽，在 Gly-21 之后为一潜在剪切位点。此位点之后为一含有 24 个氨基酸且具有 FXPRL 结构的多肽 PGN-24；全长 33 个氨基酸的 Hez-PBAN 位于 Leu-127 至 Leu-159，其 N-端具有 3 个碱性氨基酸 Gly-Arg-Arg 组成的酶切位点，C-端则有由 2 个碱性氨基酸 Gly-Arg 组成的酶切位点；紧接 Hez-PBAN 的下游是一同样具有 FXPRL 保守序列的含有 8 个氨基酸的肽 PGN-8，PGN-8 下游紧接加工位点 Gly-Arg；紧接 Hez-PBAN 的上游是两个由加工位点 Gly-Arg 分开的同样具有 FXPRL 保守序列的肽 PGN-17 和 PGN-7，分别含有 17 和 7 个氨基酸残基。与编码 Bom-PBAN 的 cDNA 完全相似，编码 Hez-PBAN 的 cDNA 在 PGN-24 与 PGN-7 之间和 PGN-8 之后，分别具有全长为 44 个氨基酸和 23 个氨基酸残基的肽。3'-端的非翻译区具有 3 个 AATAAA 共有区和典型的 Poly (A) 尾端。

由于 Davis 等在分析克隆出 Hez-PBAN 基因时，发现了一 0.63kbp 的内含子的存在。为了证实 Davis 等的结果，Ma 等（1994）通过由编码 Hez-PBAN 的 cDNA 序列确定的多个专一性引物对美洲棉铃虫基因文库进行 PCR 扩增，分段分析扩增的阳性产物，证实了在此基因中存在 5 个内含子，将 cDNA 的最大可读框分为 6 个外显子，结果见表 6-11。由表 6-11 可知，Davis 等发现的内含子是基因中的内含子 4，他们所克隆出的基因部分位于内含子 3 至 5 之间。

```
TGATTTCGAATTCCATCGTTCATTCCAAG ATG TTC AAT CAA ACT CAG TTG  TTT  GTT  TTT  30
                              Met Phe Asn Gln Thr Gln Leu  Phe  Val  Phe  10
                                                                   ↓①
CTC GCT GTA TTC ACT ACG AGC AGT GTT TTA GGG AAT AAC AAT GAT GTT AAG GAT   84
Leu Ala Val Phe Thr Thr Ser Ser Val Leu[Gly Asn Asn]Asn Asp Val Lys Asp   28

GGC GCA GCG AGT GGA GCT CAC AGC GAC CGA CTA GGT CTT TGG TTC GGT CCC CGC  138
Gly Ala Ala Ser Gly Ala His Ser Asp Arg Leu Gly Leu Trp Phe Gly Pro Arg   46
                PGN-24                              ↓②
CTC GGC AAG CGC TCG CTC AGG ATA TCT ACC GAA GAT AAC AGA CAA GCA TTC TTC  192
Leu[Gly Lys Arg]Ser Leu Arg Ile Ser Thr Glu Asp Asn Arg Gln Ala Phe Phe   64

AAA TTA CTC GAA GCC GCC GAC GCT TTG AAA TAC TAT TAC GAC CAG CTA CCT TAT  246
Lys Leu Leu Glu Ala Ala Asp Ala Leu Lys Tyr Tyr tyr Asp Gln Leu Pro Tyr   82
                                         ↓③
GAG ATG CAA GCT GAT GAA CCT GAA ACC AGG GTC ACC AAG AAG GTG ATC TTC ACC  300
Glu Met Gln Ala Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Thr[Lys Lys]Val Ile Phe Thr  100
                                                            PGN-7
CCC AAG TTA GGC GAG AGC CTC GCA TAC GAT GAC AAA AGC TTT GAG AAC GTG GAG  354
Pro Lys Leu[Gly Arg]Ser Leu Ala Tyr Asp Asp Lys Ser Phe Glu Asn Val Glu  118
                                PGN-17
TTC ACG CCC AGA CTC GGC AGG AGA CTG TCC GAT GAT ATG CCT GCC ACC CCC GCT  408
Phe Thr Pro Arg Leu[Gly Arg Arg]Leu Ser Asp Asp Met Pro Ala Thr Pro Ala  136
               ↓④
GAC CAG GAA ATG TAC CGC CAA GAC CCT GAA CAG ATT GAC AGC AGG ACA AAG TAC  462
Asp Gln Glu Met Tyr Arg Gln Asp Pro Glu Gln Ile Asp Ser Arg Thr Lys Tyr  154
                        Hez-PBAN
TTC TCC CCA AGG CTC GGC AGA ACC ATG AAC TTC TCA CCA CGA CTC GGC AGG GAA  516
Phe Ser Pro Arg Leu[Gly Arg]Thr Met Asn Phe Ser Pro Arg Leu[Gly Arg]Glu  172
               ↓⑤                           PGN-8
CTG TCT TAT GAT ATG ATG CCA AAT AAA ATC AGG GTA GTC AGG AGT ACA AAC AAA  570
Leu Ser Tyr Asp Met Met Pro Asn Lys Ile Arg Val Val Arg Ser Thr Asn Lys  190

ACG CGA TCA ACA TAATTTGGAGCAAAAACAAGACGCAAAGCTAGTCTAACCTCAAAATTTTTATAAAA  638
Thr Arg Ser Thr ***                                                      194

CGTGTTATTTTGGACGAAATAATGTACTGTTTTGTATAATAAGTATTATTAAATAATATTAAAAATTAGTATT  711
TTGTCGAAATAAAGGCTTAAGATAT(polyA)                                         737
```

图 6-9 编码 Hez-PBAN 的 cDNA 序列和推导的蛋白质序列（图中↓表示内含子插入点）

**表 6-11 Hez-PBAN 转录单元的 PCR 扩增产物**

| 内含子 | 基因片段大小（bp） | 对应的 cDNA 大小（bp） | 内含子大小（bp） |
|---|---|---|---|
| 1 | 约 1 500 | 195 | 约 1 300 |
| 2 | 约 740 | 151 | 约 590 |
| 3 | 666 | 166 | 500 |
| 4 | 721 | 157 | 632 |
| 5 | 739 | 157 | 582 |

比较编码 Hez-PBAN 和 Bom-PBAN 的基因产物可知，前激素有很高的同源性（>70%）。前激素的加工产物同样有 7 个，其中 5 个具有 FXPRL 保守序列，分属于家蚕和美洲棉铃虫的这 5 个肽不仅氨基酸数目完全一样，而且具有很高的同源性。

## 2.3　生理功能

### 2.3.1　促 SP 生物合成作用

PBAN 的生物活性是多方面的，最主要是刺激产生 SP。Teal 等（1989）和 Raina 等（1991）在白天将 PBAN 注射入 *H.zea* 雌蛾腹部，立即引起了原本需在晚上产生的 SP 提前到白天。同样，Raina 等（1994）将 PBAN 混入蔗糖液中饲喂 *H.zea* 雌蛾，也引起了雌蛾在白昼产生 SP。注射 1 个美洲棉铃虫 3 日龄雌蛾的 Br-SOG 复合体的粗提匀浆液，可恢复扎颈雌蛾（用线扎紧颈部使 PBAN 不能释放至腹部）的 SP 释放水平（Raina et al，1989）。大约 2～4pmol 的合成 Hez-PBAN 可使扎头雌蛾达到相似的 SP 释放水平（Raina et al，1987）。表明单头雌蛾 Br-SOG 中 PBAN 存贮量约为 2～4pmol。Rafaeli 等（1990）对棉铃虫的研究表明，Br-SOG 复合体匀浆液可刺激离体 SPG 从头合成 SP 的主要成分——Z-11-十六烯醛。他们用$^{14}$C-醋酸钠为起始物，用 9pmol/腺的 Hez-PBAN 和同样浓度的激脂激素刺激离体 SPG，结果表明，Hez-PBAN 刺激组放射强度显著高于其他组。利用气相和高压液相分离，根据组分的保留时间判断，$^{14}$C-醋酸钠的主要合成产物为 Z-11-十六烯醛。Hez-PBAN 对棉铃虫离体 SPG 的最佳刺激时间是加入后 4h，剂量-反应曲线为典型的 Logistic 曲线，最大反应剂量始于 5pmol/腺，之后反应趋于平稳。与美洲棉铃虫的剂量反应非常相似。若将 PBAN 注入处于光照期的活体棉铃虫体内，1h 后 SPG 中 Z-11-十六烯醛含量达最大，这一水平可持续 2h，以后缓慢下降（Rafaeli et al，1997）。若将 *S.littoralis* 的 6 龄幼虫的血淋巴或头的提取物注入 *H.peltigera* 雌蛾中，引起了后者 SP 的产生。表明幼虫体内也具有 PBAN 类似物活性。Ma 等（1996）用离体美洲棉铃虫腹部测定了分别含有 8、7、18、23、5 和 33 个氨基酸的 PGN-8、PGN-7、PGN-18、PGN-23、FSPRLamide 和 Hez-PBAN 对 SP 产生的刺激活性，结果表明，它们在 10pmol 或更小浓度时均有显著的刺激作用。同样，在对家蚕试验时发现，Bom-PBAN Ⅰ 和 Ⅱ、DH、α、β、γ-SGNP 对家蚕均有一定的促 SP 合成和释放作用，其中 β-SGNP 的活性甚至高于 Bom-PBAN。

合成 Hez-PBAN 的保留时间与自然状态下的相差很大，推测从 Br-SOG 中纯化的 Hez-PBAN 的 2 个甲硫氨酸残基（5 和 14 位）可能被氧化（Raina，1986；1990）。含有 3 个甲硫氨酸的 Bom-PBAN Ⅰ 的氧化产物的生物活性是未被氧化的 10 倍（Kitamura et al，1989）。相似的结果也在Hez-PBAN 对美洲棉铃虫的生测中发现（Raina，1991）。但 Hez-PBAN 氧化产物对大棉铃虫（*Heliothis peltigera*）无效（Gazit et al，1990），若用 N-甲硫醇乙酰胺将氧化的 Hez-PBAN 还原，又可恢复其对大棉铃虫的活性。

结构与活性分析的研究表明，C-端的 5 个特定氨基酸序列对活性表达很重要，C-端氨基酸倒位的 Hez-PBAN 活性降低到原来 1/100～/1 000（Raina et al，1990；1991）。N-端序列，本身虽无活性，但对 PBAN 完全发挥效果也是必需的。Kitamura 等（1989）报道，截去 N-端的 Bom-PBAN 虽具有活性，但比全肽活性低。对于 Hez-PBAN，C-端的 5 个特定氨基酸已能显示活性，增加到 6 个氨基酸或用 D-苯丙氨酸替代 L-苯丙氨酸显示相同的活性。但这 3 个肽的活性均只有全肽的 1/10。C-端的 6 个氨基酸组成的肽在大棉铃虫上

完全失活（Gazit et al，1990）。Nachman 等（1991，1993）报道 TPRL 具有Ⅰ型 β-折叠，这可能是 PBAN 受体所需的空间结构。

Hez-PBAN 的中间序列（15～19 氨基酸）碳端酰胺化后在 1pmol 时显示出很强的生物活性。但在高浓度下则完全失活。Bom-PBAN 相应的氨基酸序列，在 16 和 17 位上具有不同的氨基酸，对美洲棉铃虫基本无活性（Raina et al，1992）。这表明了中间序列的种间特异性。

### 2.3.2 控制表皮色素

PBAN 又称为暗化红化激素（Melanization and Reddish Colouration Hormone，MRCH），能刺激表皮暗化和细胞红褐色素的产生。Altstein 等（1994）以 Hez-PBAN 为抗体制成了抗血清，并应用 ELISA 法检查了海灰翅夜蛾色多型与 PBAN 的关系。结果表明，幼虫头内 PBAN 类似物随龄期增大而增加，且其含量总是淡色幼虫明显大于深色幼虫，至 6 龄时两者含量分别达 634fmol/头和 313fmol/头，而血淋巴中单头饲养的幼虫（淡色幼虫）PBAN 类似物含量（138fmol/头）明显低于拥挤的幼虫（深色幼虫）（268fmol/头）。这一结果说明 PBAN 与海灰翅夜蛾幼虫的色多型有关。PBAN 释放于血淋巴中，运至靶标位点，控制幼虫的暗化。Hiuma 等（1984）研究表明，十字花科粘虫的表皮暗化由来源于咽下神经节的唯一的神经激素控制。Ogura 等（1975）探知粘虫表皮的暗化和体壁中的赤褐色素由脑—心侧体—咽侧体复合体和咽下神经节所决定。Matsumoto 等（1981）证明将家蚕或粘虫的脑或咽下神经节提取液注入劳氏粘虫、灰翅夜蛾和十字花科粘虫，导致了这些幼虫的表皮暗化。Matsumoto 于 1981 年和 1988 年首先确定了粘虫和家蚕暗化红化激素（MRCH）的特征。并于 1990 年鉴定出了家蚕脑提取物中 MRCH 的初级结构。这是一个具有 33 个氨基酸残基的多肽，与家蚕中的 PBANⅠ完全同源，与 Hez-PBAN 具有 80％的同源性。自然的和人工合成的家蚕 PBAN（MRCH）在幼期使用时控制幼虫的体色，在成虫期使用时控制 SP 分泌。表明 Bom-PBAN 是在不同虫期显示不同作用的同种神经肽。

### 2.3.3 促胚胎滞育

在家蚕中，PGNs 中有一个肽被称为滞育激素 DH。此肽含 17 个氨基酸残基，同样具有 FXPRLamide 保守序列，它能诱导家蚕的胚胎滞育（Sato et al，1993）。同样，Bom-PBANⅠ、β、γ-SGNP 对家蚕的胚胎滞育也有一定的诱导作用，但活性要小得多。DH、Bom-PBANⅠ、β 和 γ-SGNP 的诱导阈值分别为 1、130、500 和 1 050pmol/虫。

### 2.3.4 刺激肌肉收缩

PBAN 还能刺激后肠和输卵管上肌肉的收缩。

## 3 释放、传递与靶标

### 3.1 释放与传递

咽下神经节和心侧体中存在高活性的 PBAN。前者的活性至暗期时下降；后者活性则

上升。如 Ma 等（1996）用 ELISA 方法定量分析了美洲棉铃虫雌、雄蛾 Br-SOG 和心侧体 PBAN 的变化，结果表明，进入暗期前 4～5hBr-SOG 复合体中含量最高，至进入暗期前 0.5h 心侧体含量升高，而 Br-SOG 含量下降。暗期 1～1.5h 和 2～2.5h 的抽样结果表明，前者进一步下降，而后者稳步上升。雄蛾中也发现了相似的变化。Ramaswamy 等（1995）发现，处于暗光周期的美洲棉铃虫，每头雌蛾血淋巴和血清中具有 10fmol Hez-PBAN 活性。ELISA 免疫反应分析亦表明，每头雌蛾中血淋巴中具有 5～10fmol 的 PBAN 类似物活性。推测 PBAN 由咽下神经节合成，传输至心侧体后，在夜晚通过神经血器官释放至血液中。对 *H.Zea* 蛾血清中 PBAN 类似物进行了进一步分析，其活性组分在Centron-3 滤纸过滤的滤液中，分子量不足 3 000u，且所有活性均由在 HPLC 分析中保留时间为 37.5min 的单一组分显示，而人工合成的 Hez-PBAN 分子量为 3 900u，过滤时处于 Centron -3 型滤纸的残渣中，在 HPLC 分析中保留时间为 42min。可见，*H.zea* 血清中的 PBAN 类似物并非 Hez-PBAN，是其降解产物还是同功肽仍需研究（Ramaswamy et al，1995）。

1 雌蛾当量的心侧体或咽侧体提取液分别注入去头欧洲玉米螟雌蛾的体内，分别引起后者腺体内 E-11-十四烯醇醋酸酯的含量为 7.5ng 和 0.24ng，移除 2 日龄雌蛾 CC/CA 复合体引起了 E-11-十四烯醇醋酸酯的合成量大幅度下降，即使注入 JH 也不能恢复 SP 的合成，而从颈部切断腹神经索或移去腹神经索均不影响 SP 的合成（Ma et al，1995）。可见，在欧洲玉米螟体内，PBAN 通过心侧体释放进入血淋巴，通过血淋巴直接传递到 SPG 上。

在其他种类的蛾中也发现了类似的结果。如 Fabrias 等（1994）用 ELISA 和离体 SPG 的活性测定表明处于暗期的 *S.littoralis* 雌蛾血淋巴中具有 5～10fmol 的 PBAN 类似物活性。Jacquin 等（1994）在处于暗期的十字花科粘虫雌蛾血淋巴中也发现了 PBAN 类似物的活性。Altstein 等（1993）将 PBAN 抗血清注入大棉铃虫的血淋巴中，封闭了 PBAN 在活体蛾内的促 SP 活性。Jurenka 等（1991）检测到红带卷蛾血淋巴中较低的 PBAN 活性。但 Rafaeli 等（1991）对棉铃虫的免疫细胞化学分析结果表明，ir-PBAN 在白昼存在于腹末神经节，而在血淋巴中却检测不到。其原因可能是由于释放至血淋巴中的 PBAN 有限，加之采样量仅为血液的一部分，故活性较低。

此外，PBAN 类似物在多种蛾中还存在于幼虫血淋巴中，如 Altstein 等（1994）在 *S.littoralis* 和大棉铃虫 6 龄幼虫血淋巴中发现了具有生物活性和相同免疫反应的 PBAN 类似物的存在。

但在舞毒蛾中，Hollander 和 Yin（1982）报道，移除腹末神经节或腹末神经节的后段神经索，阻止了舞毒蛾的召唤行为（Calling behavior）和 SP 释放；而移除脑或切断腹末神经节的前端神经索只阻止了 SP 的释放而未阻止召唤行为，这一实验结果表明脑与 SP 的释放有关。之后，Hollander 和 Yin（1985）进一步报道舞毒蛾的心侧体、咽侧体并不控制 SP 的释放，而完整的围咽神经连锁对于 SP 的释放是必不可少的。Tang 等（1987）的实验说明，脑的神经性输出对舞毒蛾 SP 的产生和释放都是致关重要的。在他们的实验中，切断腹末神经节的前端神经索使 SP 的释放量从 25ng 降低到 8.7ng。据此，他们认为没有内分泌或神经内分泌物控制 SP 的产生。Raina（1987）、Masler 和 Raina（1993）报道，舞毒蛾 Br-SOG 粗提物可激活美洲棉铃虫的 SP 释放，但扎颈阻止了舞毒蛾 SP 的产

生，且这不能被注射 Hez-PBAN 所恢复。

Thyagaraja 等（1994）的实验表明：①舞毒蛾 SP 的产生主要由头内促激素因子所控制。去头的雌蛾其 SP 及其分泌腺均处于衰竭状态，而且，与其他蛾类相反，这一状态并不能被 Br-SOG 的匀浆物或人工合成的 PBAN 所恢复（2.5ng，对照 0.3ng，二者差异不显著）。②腹神经索的切断阻止了 SP 的产生。③如果切断腹神经索，注射 PBAN 于去头的舞毒蛾可大幅度恢复 SP 的产生（4.8ng，对照 0.3ng，二者差异显著）。这暗示着神经索的切断口为注人去头舞毒蛾体内的 PBAN 提供了一个进入神经索的通道；且直接将 PBAN 送人切断腹神经索后段。将 PBAN 注射人腹末神经节或者电刺激腹末神经节，均可导致 SP 的产生；但切断从腹末神经节发出的神经或者移除腹末神经节后，再注射 PBAN，并不显著提高 SP 的产生。以上结果说明在舞毒蛾中，促 SP 产生因子通过腹神经索而传导。

这两种结果似乎矛盾，可能是舞毒蛾与美洲棉铃虫对 PBAN 的传递机制不同而造成的。用免疫细胞化学的方法分别观察了美洲棉铃虫、棉铃虫、欧洲玉米螟和舞毒蛾的神经系统，结果表明，在这几种蛾中 PBAN-ir 触突在心侧体和腹神经索中均存在（Kingan et al，1992；Ma et al，1995；1996；Rafaeli et al，1991），但不同的虫种只有 1 种传递机制在起作用。在美洲棉铃虫中，PBAN 由咽下神经节产生，由心侧体释放于血淋巴中（Riana and Menn，1987），通过血液传输。以这种方式传递 PBAN 还有烟芽夜蛾。而在舞毒蛾中，PBAN 通过腹神经索传递。此外，浅褐苹卷蛾也以这种方式传递。

### 3.2 作用靶标

PBAN 的作用靶标随不同的蛾类而异。有些蛾类 PBAN 并不直接作用于 SPG，腹末神经节在 PBAN 与 SPG 的联系中起着重要的中介作用，可能是 PBAN 刺激腹末神经节释放另一类化学信息物质，而后者则激活 SPG 的生物合成。Thyagaraja 等（1994）用电刺激经去头和切断腹神经索处理的舞毒蛾的腹末神经节，导致促信息素活性的产生。切断从腹末神经节发出的神经或者移除腹末神经节后，再注射 PBAN，并不显著提高 SP 的产生。表明腹末神经节的存在对 PBAN 活性表现是必需的。研究表明，浅褐苹卷蛾的 PBAN 通过腹神经索传输至复合神经节，后者释放章鱼胺，作用于 SPG。这与在舞毒蛾上的实验结果相似。Marco 等（1996）切断 *S. littoralis* 的腹末神经索减少了 SP 的产生。

但 Ma 等（1995）的试验表明，从颈部切断腹神经索或移去腹神经索均不影响 PBAN 刺激欧洲玉米螟对性信息素的合成（Ma et al，1995）。可见，PBAN 直接作用于 SPG 上。Rafaeli 等（1990）用棉铃虫 Br-SOG 的甲醇提取液或人工合成的 Hez-PBAN 均刺激棉铃虫离体 SPG 从头合成 SP，表明 PBAN 直接作用于 SPG。相似的结果还由 Alstein 等在大棉铃虫上得到。

Jurenka 等（1991）的研究表明，红带卷叶蛾的性信息素合成刺激因子除了 PBAN 外，还需另一存在于交配囊中的活性因子。移除交配囊或 Br-SOG 均导致 SP 浓度的下降，这种下降不被注人的 PBAN 所恢复，新羽化的雌蛾对 PBAN 刺激无反应，5 日龄雌蛾的提取物却刺激 SPG 合成 SP。随后的研究表明，交配囊提取物刺激离体腺体合成 SP，并证实了这一刺激因子为肽类（Fabrias et al，1992）。他们据此认为，由 Br-SOG 释放出的 PBAN 刺激交配囊，由后者释放交配囊促性信息素肽（BPP），BPP 再作用于 SPG 而刺激 SP 的

合成。由于红带卷叶蛾与大多数其他蛾类不同。它的性信息素合成是一直进行的，因此，需要恒定的激素刺激。而 PBAN 的释放不仅量少，而且具有昼夜节律，BPP 的存在则很好的解决了这一问题，这也许是红带卷叶蛾进化了这一机制的原因。

## 3.3　作用的介导

### 3.3.1　生物胺

Teal 等（1989）和 Christensen 等（1991）将章鱼胺注射入暗期中的烟芽夜蛾导致了 SP 的产生。同时，在暗期，对烟芽夜蛾的离体腹部通向腹末神经节的腹神经索和连接腹末神经节和 SPG 的周缘神经进行电刺激也引起了 SP 的产生，表明 PBAN 的作用可能通过章鱼胺中介。

对其近缘种美洲棉铃虫（*H. zea*）的试验却得到了彼此矛盾的结果。Christensen 等（1992）的结果表明章鱼胺能刺激 2 日龄蛾 SP 的产生，但不能刺激 3、4 日龄蛾的同样化学过程，在整体蛾中这种刺激作用呈显著的线性关系，而对离体腹部却表现"全或无"的效应。因此，认为 PBAN 刺激腹末神经节，由后者通过附着于 SPG 上的神经突触释放章鱼胺而控制 SP 的产生。Jurenka 等（1991）对 3 日龄蛾的试验结果表明，章鱼胺不刺激 SP 的产生。Ramawamy 等（1995）的进一步试验表明，章鱼胺也不刺激 2 日龄蛾产生 SP，注射 Hez-PBAN 和章鱼胺颉颃剂 mainserin 或 Hez-PBAN 和血利平的混合物，无论是整体蛾还是离体腹部，均不影响 Hez-PBAN 对 SPG 的刺激作用；Hez-PBAN 进入离体腹部并不引起 SPG 和腹末神经节（TAG）章鱼胺浓度的升高，但刺激了 SP 浓度的上升。相反，章鱼胺进入离体腹部后升高了 SPG 和 TAG 的章鱼胺浓度，但并不刺激 SP 的产生。这表明 Hez-PBAN 对 SPG 的刺激作用是直接的，不需章鱼胺中介。这一矛盾结果仍需进一步试验，如鉴别刺激 SP 的物质的受体来澄清。

Rafaeli 等（1995）以棉铃虫离体 SPG 为材料的研究却表明，类肾上腺素能促效剂章鱼胺抑制 PBAN 的促性信息素作用，使棉铃虫性信息素的主要成分 Z-11-十六烯醛的合成量显著下降。以棉铃虫离体 SPG 为材料的进一步试验表明，类肾上腺素能促效剂章鱼胺、酪氨和 clonidine 在浓度为 $10^{-5}$M、$10^{-7}$M 和 $10^{-9}$M 时便能观察到显著的抑制作用；类肾上腺素能封闭剂芬妥胺、育亨宾在＜$10^{-8}$M 时便能抵消酪胺对 PBAN 活性的抑制作用，至 $10^{-6}$M 时作用更大，另一类肾上腺素能封闭剂氯丙嗪在 $10^{-6}$M 时可抵消 $10^{-4}$M 的 clonidine 对 PBAN 活性的抑制作用。同样，clonidine（$10^{-3}$M）可明显抑制 PBAN 对活体雌蛾的促性信息素作用（Rafaeli et al，1997）。

### 3.3.2　钙离子和 cAMP

对棉铃虫的离体腺体的生测结果表明，与 Br-SOG 的提取物一起温育的腺体内的 cAMP 比对照高出 28 倍。毛喉素（来自毛喉鞘蕊花的 1 种 cAMP 酶抑制剂）、8-溴-cAMP、异丁基-甲基黄嘌呤具有同样的促 SP 活性，而 8-溴-cGMP 却无活性（Rafaeli et al，1989）。随后用 Hez-PBAN 替代 Br-SOG 提取物的研究表明，7pmol 的 Hez-PBAN 使细胞内 cAMP 提高了 230%，表明 cAMP 在 PBAN 作用中的介导作用（Rafaeli et al，1990）。

Jurenka 等（1990）对美洲棉铃虫的研究证明，毛喉素、8-溴-cAMP 和 N-苄基 cAMP 可显著刺激 SPG 合成 SP。

Teal 等（1989）和 Christensen 等（1991）试验结果表明，PBAN 刺激 SP 的合成还需钙离子的存在。同样结果也由 Jurenka 等（1991）在美洲棉铃虫上得到。他们的试验结果表明，细胞外钙离子对 PBAN 刺激离体美洲棉铃虫 SPG 的活性是必须的。而钙离子阻断剂，如镧离子、锰离子可明显的抑制 PBAN 活性。这进一步支持了钙离子对 PBAN 刺激作用是必须的这一结论。由于毛喉素、8-溴-cAMP 和 N-苄基 cAMP 在无细胞外钙离子的情况下仍具有刺激美洲棉铃虫 SP 合成的活性，推测钙离子的作用可能是参与激活腺苷酸环化酶（Jurenka et al，1991）。

Jurenka 等（1994）对红带卷叶蛾的离体腺体的试验表明，细胞外钙离子或钙离子载体 A23187 可显著刺激 PBAN 或 BPP 的活性，而钙离子通道无机封闭剂钴、镧、镍可封闭钙离子的刺激作用。cAMP 类似物 8-苄基氨基 cAMP（8BzlN-cAMP）在无细胞外钙离子时对 SP 合成有显著的刺激作用，以 0.5 和 1.0mmol/L 刺激活性最高，钙离子存在可增加刺激活性。

根据以上结果，PBAN 作用于 SPG 的方式为：PBAN 与细胞膜上的特定位点结合，刺激细胞膜上的钙离子通道，足够的钙离子进入细胞后激活位于膜上的腺苷酸环化酶，合成 cAMP，cAMP 刺激酶系统合成 SP。

但在 *S. litura* 中，Matsumoto 等（1995）用离体腺体分析了 PBAN 活性的细胞间信号传递却得到了另外的结果。他们的分析表明，离子霉素（钙离子载体）单独使用便可刺激 SP 的产生，而 $LaCl_3$（钙离子通道封闭剂），W-7、trifluoperazine（钙调蛋白抑制剂），NaF、对硝基苯磷酸（磷酸酯酶抑制剂）却阻止了 TKYFSPRL-$NH_2$（PBAN 的一部分）对离体腺体的活化作用。但毛喉素（cAMP 酶抑制剂）、豆蔻酰佛波醇乙酯（PMA）（蛋白激酶 C 活化剂）和环核苷酸单独使用不能刺激 SP 的产生。这一结果表明钙离子/钙调蛋白和磷蛋白、磷酸酯酶参与了 PBAN 活性的细胞间信号传递。

在家蚕中，Ozawa 等（1996）将离体 SPG 与 TKYFSPRL-$NH_2$（PBAN 的 C-末端部分）一起温育时，棕榈酰辅酶 A 转化成相应的 C16 醇。这种转化可被抑制剂 EDTA、$LaCl_3$、W-7、trifluoperazine、对硝基苯磷酸、NaF 和 compactin 抑制。而当 SPG 匀浆液与棕榈酰辅酶 A 和 NADPH 一起温育时，棕榈酰辅酶 A 的转化可被 compactin、W-7 和 trifluoperazine 所影响，但不被 EDTA、$LaCl_3$、对硝基苯磷酸和 NaF 抑制。这表明 compactin、W-7 和 trifluoperazine 直接抑制脂酰辅酶 A 还原酶的催化步骤，而 EDTA、$LaCl_3$、对硝基苯磷酸和 NaF 则影响 PBAN 活性的信号传递的其它生化步骤。

### 3.4 作用方式

像许多生物合成一样，蛾类的 SP 生物合成经过一系列步骤，其中有 2 个关键性的酶系统起着主要作用，即微粒体 β-氧化酶和 Δ11 脱氢酶系统。前者引起每次 2 个碳的碳链缩短，后者则在碳链的 11、12 位产生不饱和键。在家蚕中，SP 的生物合成路线为：乙酰辅酶 A→十六酸酯→（Z）-11-十六烯酸酯→（E，Z）-10，12-十六二烯酸-1-醇（蚕醇）。Arima 等（1991）将 SP 前体物 $^{14}C$-十六酸注入去头家蚕体内，再注入 PBAN 或生理盐水，

观察 PBAN 对 SP 合成链上的作用位点。结果表明在两种处理中，(E，Z)-10，12-十六二烯酸酯升高的同时，(Z)-11-十六烯酸酯并没有减少，表明 PBAN 并不控制十六酸向（E，Z)-10，12-十六二烯酸的转化。但 PBAN 的存在是去头家蚕合成蚕醇所必需的。从以上结果 Arima 等认为，PBAN 主要控制乙酰辅酶 A 的还原。在 *S. littoralis* 中，用$^2$H 标记的前体物研究 PBAN 对 SP 合成的控制，SP 主要成分为（Z，E）-9，11-十四碳二烯醇乙醇酯，研究表明 PBAN 主要控制脂酰辅酶 A 的还原。在红带卷叶蛾中，PBAN 的控制位点在或先于脂肪酸的生物合成（Tang et al，1989；Jurenka et al，1991a)。Jurenka 等（1991）对美洲棉铃虫的研究结果表明，PBAN 的存在与否并不影响 SP 合成链，但极大地降低了（Z)-11-十六烯烷的合成量。因此，他们认为，PBAN 的影响步骤应在脂肪酸合成前，这与家蚕的结论一致。中国 Zhao Chenghuo 等（1996）对亚洲玉米螟的研究亦与此一致。

在 *Heliothis* 和 *Helicoverpa* 属中，SP 的主要成分为（Z)-11-十六烯烷，这由相应的醇氧化而成。在去头大棉铃虫中，十六烯酸酯含量下降，而十六酸含量变化不大。根据以上结果，Altstein 等（1990）认为，PBAN 影响了合成链上的 Δ11 脱氢；在十字花科粘虫中，PBAN 的影响步骤是从十六酸至（Z)-11-十六烯醇而不是随后的步骤；在 *Chrysodeixis chalcites* 中，PBAN 影响 Δ11 位脱氢。

从以上结果可知，PBAN 对 SP 合成链的控制位点因蛾类不同而异。主要位点有两个，一是控制乙酰辅酶 A 转化为脂肪酸，另一是控制脂肪酸的 Δ11 位脱氢。

## 4　活性和释放的调控

PBAN 任何时候均发现存在于 Br-SOG 中（Raina and Menn，1993），但只有在暗期才开始释放（Raina and Menn，1987）。在美洲棉铃虫中，PBAN 的释放可被外部环境如光周期、温度和饲养香味等激发。

Thyagaraja 等（1994）的实验表明，如果切断腹神经索，注射 PBAN 于去头的舞毒蛾，可大幅度恢复 SP 的产生（4.8ng，对照 0.3ng，二者差异显著）；且直接将 PBAN 送入切断腹神经索的后段、将 PBAN 注射入腹末神经节或者电刺激腹末神经节，均可导致 SP 的大幅度合成；而同样的处理用于舞毒蛾活体其作用甚微。这些结果表明，胸部神经节对 PBAN 的作用具有调控作用。只有当胸—腹部之间的神经索被切断后，注射 PBAN 或电刺激腹末神经节才能产生高活性的促信息素合成作用，暗示胸部神经节中可能存在一抑制因子。

美洲棉铃虫胸部神经节的提取物并不抑制同种蛾类的 PBAN 的促 SP 活性（Raina，1994)，且切断胸—腹部之间的神经索后，注射 PBAN 或电刺激腹末神经节对高活性促信息素的产生具有作用。这暗示胸部神经节对 PBAN 活性的调节为神经活动调节而不是神经内分泌调节。

在粘虫中，虽然 PBAN 或 PBAN 类似物是粘虫中激活 SP 生物合成的主要因子，但 JH 对于 SP 的生物合成也是不可缺少的，故 Cusson 和 McNeil（1989）认为，可能是 JH 激活了 PBAN 或 PBAN 类似物的释放、控制 PBAN 产生或激活接受 PBAN 或 PBAN 类似物的腺体细胞而起作用。

Picimbon 等（1995）以小地老虎为试虫，进一步研究了 JH 和 PBAN 的关系。他们的试验结果为：①缺少咽侧体的小地老虎不产生 SP，但脑中具有 PBAN 活性。这表明 JH 并不促使 PBAN 类似物的产生。②摘除咽侧体的雌蛾通过注射头提取物或人工合成 PBAN，可恢复 SP 的产生和卵巢的发育。因此，咽侧体的激素活性并不表现在通过启动 PBAN 类似物因子的腺体细胞靶标而起作用。且由于在摘除咽侧体的雌蛾中单独的 PBAN 便能恢复其产生 SP，因此，也不存在 PBAN 和 JH 的协同效应。同时，注射 5μgJHⅢ到摘除咽侧体的小地老虎雌虫中，可引起 SP 的产生。③注射 JHⅢ到去头小地老虎雌蛾体内并不能刺激 SP 的产生。这表明 SPG 并不是 JH 的直接作用靶标。以上结果表明，由咽侧体分泌的 JH 通过刺激脑内 PBAN 类似物的释放而控制 SP 的合成。

## 5 降解

Werich 等（1995）加入氚标记的正亮氨酸合成了 Hcz-PBAN（[$^3$H] NLPBAN），将其加入烟草天蛾和美洲棉铃虫的血淋巴中离体温育，形成了几种氚标记的降解产物。当[$^3$H] NLPBAN 浓度为 0.9mM 时降解速率为 2～10fmol/min/ml 血淋巴。[$^3$H] NLPBAN 在烟草天蛾血淋巴中的初级降解反应不被 20mmol 亮抑酶肽、0.1mmol 氨肽酶抑制剂、1mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）、1mmol/L 乙二醇（2-氨基乙醚）四乙酸（EGTA）、1mmol/L 的 1，10-菲咯啉或 2mmol/L 的 4-（2-氨乙基）氟化磺酰基苯所抑制。但上述抑制剂可抑制次级反应。以上结果表明，烟草天蛾和美洲棉铃虫血淋巴中含有使 PBAN 降解的肽酶。

# 第七章 昆虫体内的生物胺及其受体

自20世纪50年代以来，众多的研究者进行了大量有关神经分泌的研究，获得了很多脊椎动物和无脊椎动物神经分泌的资料。近年来研究结果表明，神经分泌产物不仅包括胺能分子，而且包括肽能分子。两者既可产生于神经分泌区域，也可产生于整个神经系统及其外周区域。同一神经元，不但能产生经典的神经递质，如乙酰胆碱、谷氨酸或γ-氨基丁酸（GABA）而且能合成几种不同分子的神经肽和一元胺。同一种神经分泌产物既可作为神经激素，也可作为神经递质或神经调质，这完全取决于它们的释放与作用位点，从而使传统的神经激素、神经递质和神经调质的区分失去了意义，生物胺就是典型例子。本章主要介绍近十几年内昆虫神经分泌研究情况，特别是神经内的生物胺及其受体的情况。

## 第一节 神经分泌的细胞学

17世纪末至18世纪初的一些基本发现就告诉我们，某些器官和组织中存在一些因子，它们具有调节器官和组织的功能。这些因子主要位于高等动物的胰岛、小肠和脑垂体中，提取物能影响血液中糖的水平、胰液的释放、血压变化以及子宫的收缩。经过对这些因子的长期研究，终于在1921年发现了神经递质。

Speidel（1919）和Scharrer（1928）描述了脊椎动物中某些神经元分泌活动的存在，到1937年，Scharrer等明确表达了某些神经元具有腺性活动的观点。以后的研究表明，这些腺样神经元的分泌物沿着其轴突移动，贮存在轴突末端。至1944年阐明了神经腺样复合物的存在，包括位于中央神经系统中的神经元以及末端腺样贮存器官，此后就形成了神经分泌的概念。在突触间

隙传递神经冲动的称为神经递质（neurotransmitter），神经分泌物中能使远距离受体产生生理功能的称为神经调质（meuromodutoa），作用于腺体样受体的称为神经激素（neurohormone）。这些观念的建立为以后神经分泌的大量研究奠定了基础，导致了由神经分泌细胞产生的各种神经激素、神经递质以及神经调质的化学结构和生理作用的发现。

随着电镜、放射自显影以及生物胺检测新技术的出现，有关神经分泌、神经递质的研究快速发展起来。依靠这些新技术，使得对调控神经分泌产物的合成、运输和释放的研究成为可能。对脊椎动物和无脊椎动物的超微结构研究表明，神经分泌细胞和纤维包含大量电子致密的分泌颗粒，直径 100～300nm。首先发现其中含有催产素和后叶加压素活性，基本颗粒中除了神经激素外还含大量载体蛋白，两者结合成为前体大分子。基本颗粒沿着轴突运动通过酶促分解，导致神经激素和载体蛋白的分离。两者同时释放于作用位点（Pickering，1980）。

Heller and Ledcris（1962）发现基本颗粒在内质网以及高尔基体小泡中合成。研究神经分泌产物释放机制的结果表明，神经分泌细胞与其他神经元一样，也有动作电位，但持续的时间很长（Yagi and Berh，1963）。动作电位到达神经分泌轴突末端后，提高膜渗透性和钙离子运动的电刺激，从而诱导神经体液贮存器对神经分泌产物的释放（Douglas and Poisner，1964）。

从 Palny（1957）研究第一个神经超微结构开始，就在神经分泌末端观察到了成簇的富电子小泡。这些小泡与突触小泡的形态相似，通过膜的渗透性变化可以调节神经末端分泌物质的释放。一些学者认为这是真正的神经递质乙酰胆碱突触小泡，而大多数研究者认为，这些小泡不是释放乙酰胆碱的，它的产物与另一类原初颗粒的结构在释放位点上是瞬间出现的，其数量只在电刺激后短时间内迅速上升。

20 世纪 60 年代，某些神经分泌末端的重要性引起了广泛注意。这些神经分泌末端不位于神经体液器官（如垂体、神经部、下丘脑正中隆起）附近，而是位于脑垂体的腺样部分，邻近分泌细胞或与分泌细胞有紧密的接触，形成了促分泌接点。Scharrer（1965）在组织学中观察到神经分泌小泡，并在电镜研究中证实了促分泌接点的存在。研究发现，神经分泌轴突末端与结缔组织、腺样细胞、神经细胞甚至肌肉细胞紧密接触，最著名的促分泌接点是在硬骨鱼脑垂体外远叶上。在神经末端有 A、B 两种神经分泌物，分别对应于神经支配垂体的肽能和胺能纤维。

促分泌接点也称为神经效应器接点，它的发现部分地修改了神经分泌的概念。有学者认为激素释放进血液不能看作是分泌神经元的唯一功能（Kmowces and Bern，1966）。同时另有学者认为从中央神经系统到内分泌腺共同的通路，存在两种不同方式的神经分泌肽能神经元，终止于神经体液器官或者腺细胞。

当许多研究者对神经效应器接点疑惑不解的时候，另一个问题成为争论的焦点，它涉及到一些特异神经分泌细胞，其分泌产物不能用苏木精染色，但可以用酸性染料染色。这些神经分泌产物发生于下丘脑正中隆起、中间部垂体、远侧部垂体以及多种无脊椎动物的中央神经系统中。超微结构研究显示，这些颗粒或小泡不同于经典的基本颗粒，事实上它们产生的是一种新的神经分泌产物——生物胺（Bargmann，1996）。

## 第二节 生物胺及其功能

在神经递质的研究中，最初发现的是去甲肾上腺素（norepinephrine），以后又发现了乙酰胆碱（acetylcholine，Ach）。Dale（1993）因此将神经纤维分为肾上腺素能神经（adrenegicnerve）、胆碱能神经（chdinergicnerve）两类。在昆虫中，最早在蜚蠊腹神经节中发现了乙酰胆碱，以后证明这是昆虫的主要神经递质，但并非唯一的兴奋性递质。后来在蜜蜂和蜚蠊脑中，发现了谷氨酸盐（glutamate）作为神经递质，在蜚蠊后肠神经突触中还发现了肽类直肠肽也具有递质功能。在抑制性神经中，神经递质是γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA），它不仅存在于蜚蠊神经系统中，也存在于节肢动物和其他昆虫体内。近年来，一个重要发现是生物胺中某些一元胺（即单胺）（monoamine）参与神经冲动的传递，如儿茶酚胺类（catecholamines）中的章鱼胺、多巴胺、去甲肾上腺素；吲哚烷基胺类（indolalkylamine）中的5-HT。在昆虫体内的生物胺中，章鱼胺和5-HT特别丰富，而肾上腺素和去甲肾上腺素的量远不如脊椎动物。生物胺广泛的影响着昆虫的代谢活动和生理行为。另外，酪胺和多巴胺还是昆虫表皮鞣化剂的前体，这就更增添了生物胺在昆虫体内的多功能色彩。

生物胺广泛存在于神经系统中，在脊椎动物体内包含神经分泌细胞的下丘脑正中隆起以及神经分泌细胞纤维末端的神经体液区域都有大量的生物胺。生物胺与肽类是控制神经分泌细胞调节脑垂体和腺细胞分泌活动的重要物质。这种调节在高等动物中通过血管，在硬骨鱼中通过神经效应器起作用。事实上，在正中隆起和促性腺功能的研究中，已证实生物胺能调节远侧部垂体活性，此外它们还具有其他功能。在某些昆虫中，生物胺的作用与肽能神经分泌产物的作用相同，它以神经分泌细胞形成大量轴突和树突并与体细胞接触，释放进入血淋巴中或者至神经效应器接点。

### 1 神经调质功能

生物胺具有神经调质的功能，它并不参与诱发冲动的跨突触传递，而是调节神经冲动中加速或抑制突触传递，作用方式比神经递质更广泛和遥远，其效果持续得更长。神经调质的释放位点是突触，作用于末梢、轴突、树突或体细胞的特定受体，一般不通过钠离子，而类似于神经激素通过钙离子发挥作用。但Scavone等（1994）发现蜚蠊脑与神经节中一元胺的吸收与释放是依赖于钠离子的。一元胺作为神经调质时，与神经递质在不同分子共存的轴突末端分别或同时释放，并且通过高低不同的频率调节神经冲动。当不同的分子一起释放时，每种分子都有其特定的作用。如一个作用为神经递质，另一个则作为神经调质，有的会产生抑制神经递质的反馈效应（feedbackeffects）。

在蝗虫第3胸节背面有一群神经元，分泌章鱼胺，调控支配后足肌肉的运动神经。在蝗虫的后足胫节伸肌纤维上，分布着章鱼胺受体，来自脑部背面不成对运动神经元释放的章鱼胺，促进肌肉放松，在肌纤维表面的慢神经的突触上的章鱼胺受体，受章鱼胺介导增加开关幅度。分泌章鱼胺的神经末梢并不与肌纤维形成突触，只与快神经、慢神经及抑制性神经形成突触，因此章鱼胺对胫节伸肌只起神经调质作用（Evans，1984）。

### 2 神经递质功能

生物胺在昆虫体内作为神经递质最典型的事例是萤火甲外周神经分泌章鱼胺对发光作用的调控，最早是Carlson（1968）提出的。当时发现苯胺对发光器有明显效应，以后用外源性肾上腺素能促使萤甲发光，但最终测定结果表明，萤甲体内作为神经递质的不是肾上腺素而是章鱼胺。后来在蝗虫体内也发现章鱼胺调控心侧体释放肽类激素。

已有的研究结果表明，生物一元胺也参与调节神经细胞的合成和释放，这已在脊椎动物下丘脑和垂体神经部得到证实，控制的主要方式是通过多巴胺和去甲肾上腺素。5-羟色胺和肾上腺素也参予某些调节过程。另一方面Upioids可以两种方式调节同一过程，不但有控制下丘脑神经分泌多巴胺和去甲肾上腺素的功能，而且直接作用位于正中隆起和垂体神经部的神经分泌末端。

当神经递质产生作用时，首先是与受体结合，如果受体本身是某种离子通道，则反应直接而迅速。例如，烟碱样乙酰胆碱受体通道。有的递质作用于受体需要经过G-蛋白，产生胞质第二信使cAMP，再激活某种离子通道。在脊椎动物中，肾上腺素即可引起细胞内的cAMP水平的增加，最终导致肌肉内糖原的分解。递质与受体结合，激活膜上的腺苷酸环化酶，进而将ATP转化为cAMP。cAMP与蛋白激酶结合，再由这种激酶作用于磷酸化的靶蛋白，从而改变蛋白的活性，并产生生理或代谢反应。因此，蛋白质磷酸化是控制细胞内活动的主要机制（Nestler and Greengard，1984）。有时1～2个递质分子会引起一连串的反应，使更多的第二信使和靶蛋白分子磷酸化，最终导致膜电信号的变化。

受体与腺苷酸环化酶之间的联系受到G-蛋白的调节。G-蛋白在受体和质膜内表面分子之间来回穿梭，因此称为“细胞梭”。腺苷酸环化酶可以被不同递质激活或抑制，这种作用是由3种G-蛋白完成的，其中Gs可直接激活腺苷酸环化酶，Gi则产生抑制作用（Leritiki，1986）。

### 3 神经激素功能

生物胺作为神经激素，Downer（1979）对蜚蠊的研究提供了很好的例子。当蜚蠊面对应激反应或开始飞行时，章鱼胺诱导脂类和糖类的代谢，以适应生理状态变化的需要。章鱼胺激活对其敏感的cAMP，从而介导糖酵解并从脂肪体内使脂肪由贮存型快速进入代谢。这时蝗虫体内的章鱼胺水平可由静止状态时33nmol上升到飞行开始时的173nmol。而在持续飞行时再迅速下降。在蜚蠊体内章鱼胺能诱导高海藻糖反应（Goosey and Candy，1980）。

## 第三节 生物胺的代谢

昆虫的体内主要的生物胺合成的知识，大多来自脊椎动物。酪氨酸脱羧基成为酪胺，在羟化酶的作用下生成章鱼胺。色氨酸在羧化酶作用下，形成5-羟色氨酸，经过脱羧基即成为5-HT。但昆虫体内许多生物胺完整的合成路线尚未搞清。在美洲蜚蠊体内，已经

证明存在5-HT合成过程中两种酶，在沙蝗和天蛾的神经系统中，章鱼胺可能来自酪氨酸衍生物，而在美洲蜚蠊中，可能是从酪胺衍生物来的。羟化酶或羧化酶合成以后，贮存在囊泡中，由前突触释入突触间隙。递质可能重新吸回进入前突触，或被后突触所代谢。酪胺和色胺代谢产物参与表皮鞣化过程。

昆虫神经系统中生物胺的代谢失活遵循两种机制。一种是合成作用，生物胺与葡糖醛酸、葡糖、硫酸盐、甲基、乙酰基等代谢物轭合，引起生物胺失活，常见的是在儿茶酚胺芳香环羧基上与甲基或硫酸共轭，这是一种耗能反应；另一种是通过线粒体表面单胺氧化酶（monoamine oxidase，MAO）的氧化作用，催化儿茶酚胺氧化脱氨变成醛类，再进一步催化形成醇或酸。据Cook和Orchard（1993）报道，昆虫体内MAO活性较低；而Kalfman和Soley（1996）发现花蜱（*Amblymma hebraeum*）体内MAO含量很高，将一些组织温育，各组织中活性（pmol/mg/h）分别为体壁肌≈100，马氏管≈50、卵巢≈45，唾腺≈30，中肠≈20，血淋巴≈4～5。MAO作用于多巴胺使其转化为二羟基苯乙酰乙酸（dihydroxyphenyl acetiacid，DOPAC）和5-羟基吲哚乙酸（5-HIAA）。经N-乙酰化γ-谷氨酰轭合的分离，在产物中检测到邻-甲基香草酸（HVA）或3-甲氧色胺（3-methoxytramine）。生物胺的代谢途径见图7-1。

## 1　酪氨酸羟化作用

在动物中，酪氨酸羟化酶转化酪氨酸成为L-3、4-二羟基苯丙氨酸，即L-多巴（L-dopa），这是儿茶酚胺生物合成中的一个限速步骤，需要分子氧、铁离子和四氢蝶啶作为辅助因子（McGeer，et，al，1979）。昆虫的酪氨酸羟化作用通过原酚氧化酶，果蝇和丽蝇幼虫的抽提物与血液中的酶作用而活化以后，生成L-多巴和酪氨酸的氧化物（图7-1）。

## 2　色胺酸羟化作用

在昆虫神经组织中，转化色氨酸成为5-羟基色胺酸。在动物体内由色胺酸羟化酶催化起始反应，并成为5-HT合成的限制性步骤。这种酶也需要四氢蝶啶和含铁辅助因子（图7-2）。

## 3．脱羧作用

在多种昆虫体内都发现有多巴脱羧酶。在蜚蠊脑组织的匀浆液中，它使L-多巴脱羧成为多巴胺。在黄猩猩果蝇脑和胸神经节中多巴脱羧酶的活性较低（Dewhurst et al，1972）。在节肢动物中酶促反应的生成物是表皮鞣化所必需的。

在丽蝇中，蜕皮酮通过对多巴脱羧酶，mRNA的滴度的调控，增强多巴脱羧酶的合成，Whitehead（1969）曾经指出，在美洲蜚蠊多巴胺的形成过程中，血淋巴中酪氨酸脱羧酶启动酪氨酸代谢。然而，Hopkins等（1976）认为，表皮形成时通过多巴脱羧酶使L-多巴成为多巴胺，多巴脱羧酶在蜕皮前酶的活性快速增加，在表皮鞣化时达最大值。在蜕皮间期的活性相对较低。在美洲蜚蠊中多巴脱羧酶在蜕皮周期中，血淋巴和体壁内活性增加，而脂肪体和消化道内没有明显变化，说明它与表皮鞣化有关。

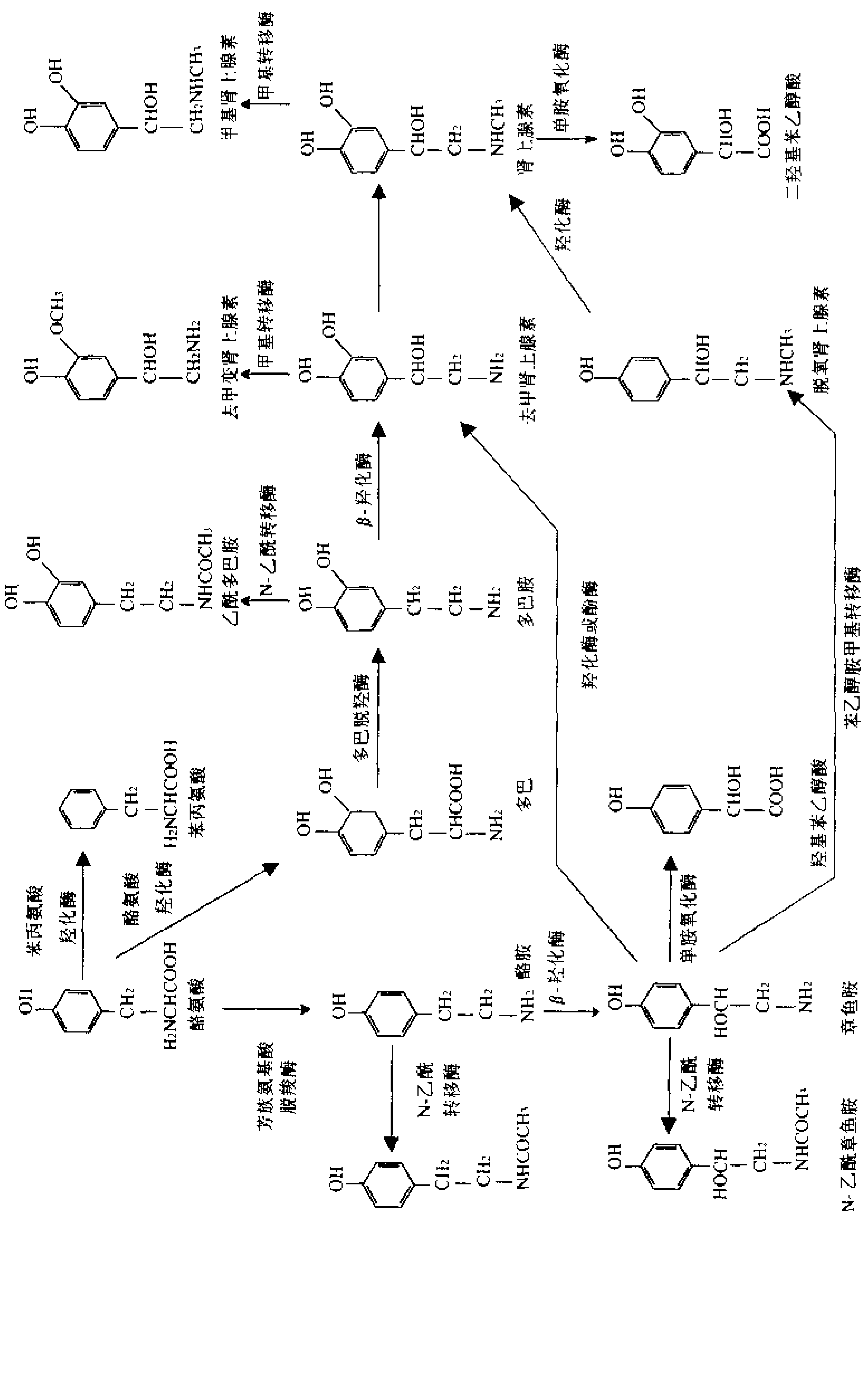



图7-1　酪氨酸为起点的生物胺的合成与分解途径

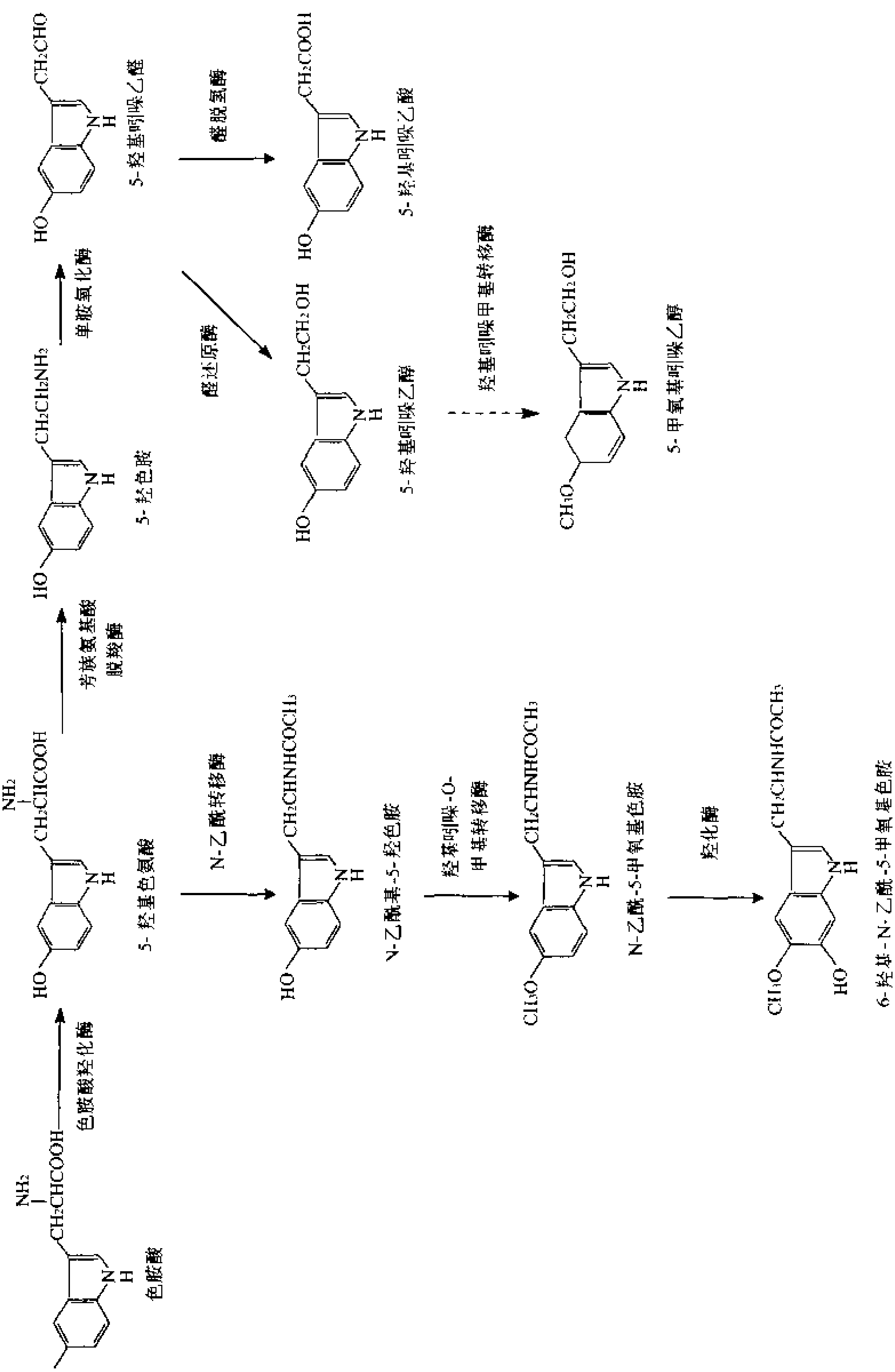



图7-2 色氨酸为起点的生物胺合成与分解途径

## 4　β-羟基化

在蜚蠊体内β-羟化酶使多巴转化为去甲肾上腺素（Lake et al，1970）。多巴胺β-羟化酶能使苯乙醇胺（如多巴胺和酪氨酸）羟基化后分别转化成去甲肾上腺素和章鱼胺，抗坏血酸在其中作为还原剂。在该酶中含有紧密结合的铜。

## 5　N-甲基化

苯乙醇胺转甲基酶能转化去甲肾上腺素成为肾上腺素，将甲基连接到前者自由胺基上。苯乙醇胺、去甲肾上腺素、去甲-3-O-甲基肾上腺素（normetanephrine）、章鱼胺以及芳香胺都是该酶的底物（Grunewald et al，1975）。肾上腺素在一些昆虫组织中虽有发现，但它的功能还不是太清楚。

## 6　N-乙酰化

在昆虫中，苯乙醇胺类、儿茶酚胺类和吲哚烷基胺类的N-乙酰化是代谢的主要途径（Nisbimura et al，1975等）。这个过程包括神经递质的失活和表皮鞣化时N-乙酰多巴胺的形成。

Dewhurst等（1972）曾经测定了N-乙酰转换酶在昆虫体内的活性、它对酪氨酸、多巴胺和5-HT的乙酰基转移都很重要。发现在果蝇脑、胸部神经节和马氏管中活性较高，而体壁肌中活性较低。

在美洲蜚蠊中酪氨酸通过乙酰转移酶代谢成为N-乙酰多巴胺和N-乙酰酪胺，两者是昆虫骨化作用中醌的前体。N-乙酰转移酶受鞣化激素（bursicon）的控制，而N-乙酰化合物的合成，不受鞣化激素的影响。

## 7　二酚氧化作用

N-乙酰多巴胺是二元酚，在昆虫体内作为表皮的骨化剂（Karlson等，1962）。这些化合物在血淋巴中与蛋白质进行保护性轭合，复合物在表皮中形成基质，酚被氧化成为醌，以共价键与氨基结合，而使蛋白质交链。N-乙酰多巴胺的边链β-位上也可以与蛋白缩合，完成表皮的β-骨化。

## 8　单胺代谢物的轭合

以氨基酸、糖类、硫酸盐和磷酸盐与单胺代谢物轭合。在美洲蜚蠊新蜕皮时，N-乙酰多巴胺迅速转化成为N-乙酰多巴胺-3-O-硫酸盐或磷酸盐，这些N-乙酰多巴胺酯类化合物在骨化时进入表皮内。N-乙酰多巴胺作为骨化剂在血淋巴中与蛋白质结合进入皮细胞（Bodnaryk等et al.，1974）。

## 9　氧化脱氨基作用

单胺氧化酶的氧化脱氨基作用，使儿茶酚胺类和5-HT成为相应的醛类。单胺氧化酶在一些昆虫组织中都存在活性，但在果蝇脑中活性较低。氧化多巴胺的MAO对5-HT并

没有氧化活性（Richter et al，1977）。在伏蝇（*Phormia regina*）中有乙醇胺氧化酶（Kalkarni and Hodgson，1973）。

MAO位于线粒体外膜上，并存在A和B两种型式（Sandler and Yondim，1972），在不同动物内有其专一性。单胺氧化酶的脱氨基作用，使一些神经递质不能达到突触间隙，也不作用于后突触受体。

### 10 还原与氧化作用

由MAO的胺类氧化的脱氨基作用，包括多巴胺、肾上腺素、5-HT侧链的后续代谢，它依赖于NADPH醛还原酶，该酶还原醛为醇或酸。如吲哚乙酰醛氧化成为吲哚乙酸。

醛还原酶存在于脑神经细胞质中，酶活性是胞外的。突触体中活性来自前突触中MAO。醛还原酶具有多型性，并有广泛的专一性底物（Turner and Tipton，1972）。Tabakoff等（1973）在胞质与线粒体还分离到醛脱氢酶。

### 11 O-甲基化作用

儿茶酚-O-甲基转移酶从甲基供体S-腺苷甲硫氨酸上转甲基到儿茶酚芳香环的羟基上。果蝇脑和前胸神经节中（Dewhurst et al，1977），从神经末梢释放儿茶酚胺类到突触间隙，在儿茶酚甲基转移酶代谢之前，接近后突触体。甲基化作用有胞质型和质膜型两种不同的调节机制。

## 第四节 昆虫体内主要生物胺及其受体

### 1 章鱼胺

章鱼胺（octopamine）是含一个羟基的去甲肾上腺素类似物，首先发现于章鱼（octopus）的唾腺内（Erspamer and Boretti，1951）。它在昆虫的不同组织内呈高浓度的特性（Axecrod and Savedra，1977；Orchard，1982；Evans，1985）。这种特性在昆虫神经系统内不同部位都有发现（Evans，1978）。含有章鱼胺的神经元支配着昆虫脑的几乎所有的神经（Dymond and Evans，1979；Komings et al，1988；Braunig，1991）。实验证实章鱼胺在外围组织内具有神经激素、神经调质和神经递质的三重功能。

#### 1.1 章鱼胺与飞行时的脂肪代谢

章鱼胺经过单胺氧化酶等4个途径的氧化和轭合代谢，其代谢产物参见图7-3。

当昆虫处于某些压力下以及在飞行开始时，章鱼胺从心侧体释放到血淋巴中发挥其神经激素的功能，使昆虫在需能时从碳水化合物代谢迅速转变到脂肪酸代谢，成为飞行昆虫的换能触发器（Orchard and Lange，1985）。在离体实验中，如果章鱼胺的处理浓度达到一定水平，则蝗虫的脂肪体就会释放脂肪酸。当蝗虫开始飞行后不久，章鱼胺对脂肪的动员和利用起着调控作用，在血淋巴中章鱼胺的滴度瞬间升高2倍，使血脂浓度升高到3mg/ml。经过25min以后，飞行达到恒速时，脂肪动员激素发挥出它的作用，章鱼胺的

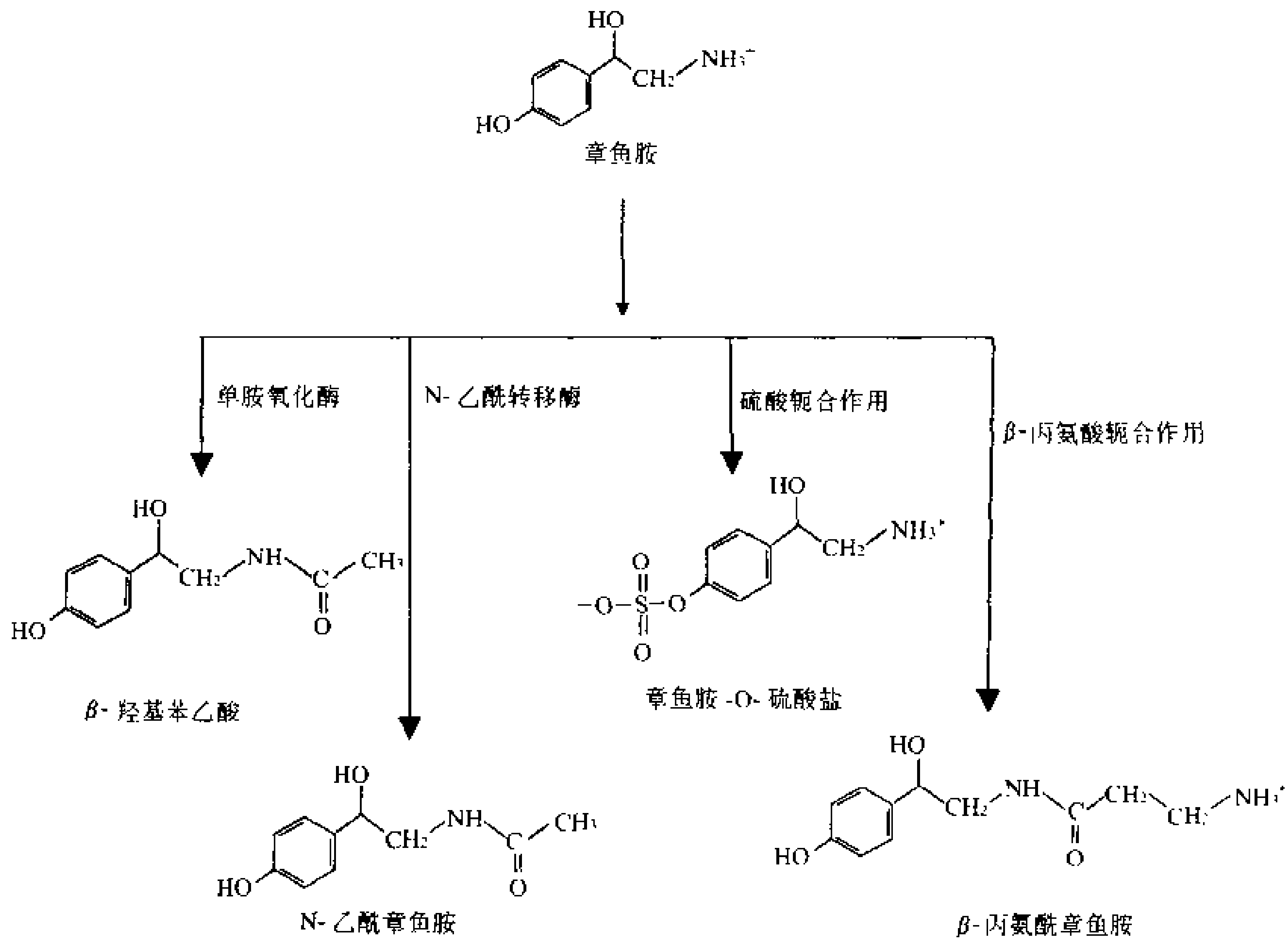



图 7-3 章鱼胺代谢途径与代谢产物

浓度开始回复到原来水平。Orchard（1984）用蝗虫的外胫肌仔细研究了章鱼胺的神经调节功能，发现一个支配胫节伸肌的背部不成对联络神经元，这是一种含有章鱼胺的神经元，它调控肌肉的收缩。章鱼胺对肌肉神经元的功能调节，使昆虫能适应不同的生理需要（Evans，1985）。

## 1.2 章鱼胺与萤甲发光

章鱼胺作为神经递质在少数几种昆虫中得到证实，其中萤甲神经产生的发光效能是一个非常典型的例子。萤甲的发光器也受背部不成对联络神经元的控制。如用章鱼胺单独刺激这类神经元，同样可引起发光器发光（Nathanson，1979）。产生章鱼胺的神经还支配着心侧体，并随着神经元的活化促使脂肪动员激素发挥作用，通过 cAMP 将甘油二酯释放进入血淋巴（Orchard and Lange，1985）。

除了萤甲的发光器以外，许多外围器官，如肌肉、脂肪体、输卵管以及昆虫的感觉器官都是章鱼胺的作用位点。而章鱼胺的作用并不局限于外围组织，当它作用于其他部位时，也能引起不同的生理反应。如将章鱼胺注射到蝗虫及天蛾后脑神经节的某些特定位置时，能使蝗虫及天蛾表现出一种类似行走的飞行方式（Sombati and Hoyle，1984；Claussen and Kammer，1986），甚至在缺少任何翅的初龄蝗虫中也表现类似的效果

(Stevenson and Katsch, 1986)。凡含有并能释放章鱼胺的背部不成对联络神经元，都可以进行自身调节（Washio and Tanaka, 1992)。昆虫复杂的行为（例如学习及记忆等）均受章鱼胺的调节。将章鱼胺注射到被认为是蜜蜂嗅觉记忆部位的蕈体中，能提高蜜蜂记忆的贮存和回忆（Zerber et al, 1980; Heisenberg et al, 1985)。章鱼胺对于学习、记忆等活动的影响似乎是一种普遍现象。用章鱼胺类药物处理果蝇，也使飞翔能力发生变化（Dudai, et al, 1987)。

### 1.3 章鱼胺与神经活动

为了弄清章鱼胺影响行为的细胞学基础，相关的细胞进行了电生理学方面的研究。将章鱼胺作用于与飞行运动有关的联络神经元和运动神经元，结果导致肌肉的极度兴奋和电势的相对稳定（Remirez and Pearson, 1991)。在甲壳纲的胃神经节中也观察到类似的现象。如果在甲壳纲的胃神经节部位有过多的章鱼胺一类神经调质，则会引起全然不同的行为模式（Flamm and Harris-Warrick, 1986)。昆虫根据章鱼胺的水平控制参与活动的神经元，从而产生不同的运作神经输出（Hoyle, 1986)。如果把章鱼胺作用到蝗虫的神经上，这些神经元就会有电反应（Suter, 1986)。

章鱼胺还能促进神经组织（包括神经节鞘细胞层和神经胶细胞）糖元的分解和动用，从而滋养神经轴突和为运输提供能源。此外还有研究表明，章鱼胺能激活磷酸化酶。当用0.1mm的章鱼胺处理神经，即能使磷酸化酶活性提高48%，这种激活与诱导cAMP的合成有关。

昆虫组织内的章鱼胺作为神经递质和神经调质。在蜚蠊及蝗虫的神经组织内发现它的摄入与钠离子的参与有关（Orchard, 1990)。

### 1.4 章鱼胺与JH合成

Thompson等（1990）认为在昆虫体内有一种咽侧体内源性章鱼胺，它是作用于JH的神经调质，调节咽侧体离子通道和咽侧体末端释放抑制肽。

章鱼胺对昆虫成虫体内JH的合成具有明显的调控作用。Lafon-Cazal和Bachr（1988）发现章鱼胺促进飞蝗JH的合成，而Neuhauser（1994）报道章鱼胺抑制太平洋折翅蠊（*Diploptera punctata*）JH的合成 Woodring和Hoffmann（1994）对章鱼胺调控二点蟋蟀咽侧体合成JHⅢ的机制进行了离体试验，发现章鱼胺最大的抑制浓度是$10^{-4}$M，抑制峰出现在3日龄成虫中，以后到6日龄期间JHⅢ的合成处于低水平状态。这种抑制是以钙离子作为第二信使起作用的，在基质中将钙离子浓度高到25mM，能使JHⅢ的合成增加3倍。高浓度的钙离子可以克服章鱼胺或咽侧体抑止肽-1对JH合成的抑制作用，因此Woodring和Hoffman（1994）认为钙离子在逆转章鱼胺的抑制作用中起重要作用。章鱼胺-2颉颃剂酚妥拉明或芦竹碱（gramine）并不破坏章鱼胺对JHⅢ的抑制，说明二点蟋蟀体内没有章鱼胺-2的受体，其中咽侧体细胞膜上钙离子流有关的受体可能起重要的作用。此外还发现多巴胺或5-HT对初日龄二点蟋蟀咽侧体合成JHⅢ无抑制作用，但随着日龄增加，JHⅢ合成活性的增加，抑制作用也逐渐变得明显。

### 1.5 章鱼胺与血细胞凝集

章鱼胺可能成为一种血细胞激动素。在大蜡螟体内昆虫受病原微生物感染以后，血淋巴中章鱼胺含量上升。初始非自体触发之后，激发血细胞的活性，但一种真正的血细胞激动素原酶氧化酶并不是由章鱼胺激活的（Chadwik and Aston，1999 和 Dunphy 等，1994）章鱼胺和激活的原酶氧化酶系统促进血淋巴中细菌的死亡。Dunphy 等认为蜡状芽孢杆菌激活黑化系统（与马得拉蜚蠊体内情况相同），还增加血细胞接触，有利于细胞凝聚。

章鱼胺因为具有氨基团，在大蜡螟血淋巴 pH6.5 的情况下带有正电荷，阳离子溶菌酶结合到细菌的负电荷表面（Varra，1992），促使细菌粘附到昆虫血细胞上，章鱼胺的正离子电荷结合到带负电荷的蜡状杆菌 *B.cereus* 和 *X.nematophilus* 上，并促进血淋巴中细菌的死亡。胺基可能在抗原与血细胞之间像外源凝集素（lectin）一样作为分子桥加强细菌与血细胞的结合（Richards and Ratcliffe，1990），或者由于细胞表面较弱的负电荷，减低了细胞之间静电斥力而增加凝聚力。因此在章鱼胺的介导下，促进了血细胞之间凝聚和对细菌的包围。无论凝集作用和成瘤作用都引起细菌死亡。

### 1.6 章鱼胺与信息素

Christensen 等（1992）报道，章鱼胺存在于烟芽夜蛾雌蛾的性信息素腺体中。随着光周期的变化，腺体中章鱼胺含量变化非常明显，在光照周期中，含量为 160fmol/腺体，在黑暗周期开启前上升到 320fmol/腺体。章鱼胺诱导雌性信息素的产生，同时也促进飞行活动和产卵活性水平的提高，但对老龄雌蛾无效。在光照周期中，即使注入外源性章鱼胺也没有这种生理活性。

## 2 章鱼胺受体

章鱼胺腺苷环化酶是章鱼胺的一种受体。这种受体在数种昆虫的外周神经及中枢神经都有过研究。当使用磷酸二酯酶抑制剂 3-异丙基-1-甲基花黄素（IBMX）与双萜（difeperne)或腺苷酸环化酶活化剂时，明显控制章鱼胺对 cAMP 的调节作用。

以蜚蠊的神经系统为对象（Nathanson and Greengard，1973）研究昆虫外围组织的章鱼胺受体，尤其是萤甲的发光器（Nathanson，1979，1985）和蝗虫的外胫肌（Evans，1985），成为当时唯一的发现于无脊椎动物内章鱼胺受体。这些实验已成为研究昆虫章鱼胺受体的模式。因为脊椎动物体内不存在这种受体。

Evans（1982）在蝗虫的外胫肌部位，根据药理学特征将章鱼胺受体其分为 3 类：1 型、2A 及 2B 型。其中存在于外围组织的大多为 2A 型受体。这些组织包括蝗虫的脂肪体(Lange and Orchard，1990)、飞行肌（Lafon-Cazal and Bockaet，1985）、输卵管（Orchard，1986）以及萤甲的发光器（Nathanson，1985）。Lange 和 Orchard（1990）发现苯妥拉明在蝗虫肌肉中和卵巢中抑制章鱼胺-2 受体，破坏章鱼胺对合成 JH 时的促咽侧体效应。在太平洋折翅蠊中苯妥拉明或芦竹碱都不破坏二点蟋蟀体内章鱼胺的抑制作用。这可能与二点蟋蟀体内章鱼胺-2 受体特异性有关。后来还发现中枢神经内的章鱼胺受体另有一种不同的药理学特征（Guillen et al，1989），研究证实它属于另一类章鱼胺受体，因此

被命名为3型（Roeder，1992）（表7-1）。

**表7-1 昆虫体内按抑制剂分类的章鱼胺受体型**

| 1型［蝗虫肌肉］ | 2A型［蝗虫肌肉］ | 2B型［蝗虫肌肉］ | 3型［蝗虫脑］ |
|---|---|---|---|
| 酚妥拉明 | Metoclopramide | 酚妥拉明 | Mianserin |
| 氯丙嗪 | Mianesrin | Metoclopramide | 酚妥拉明 |
| 育亨宾碱 | 酚妥拉明 | Mianscrin | 氯丙嗪 |
| Mianserin | 氯丙嗪 | 氯丙嗪 | Metoclopramide |
| — | — | — | 育亨宾碱 |

资料来源：Evans（1981），Evans and Gee（1980），Roeder and Gewecke（1990），Roeder（1992）氯丙嗪（Chliprmazine），育亨宾碱（Yohimbine），酚妥拉明（Phentolamine）

章鱼胺受体在昆虫的神经组织内并不是均匀分布的。在中脑内，含章鱼胺受体最多的部位是蕈体。类似的受体分布形式在蜜蜂的脑内也有报道（Scheidler et al，1986）。

章鱼胺受体的药理学特征不仅在其分类上具有重要性，而且对研制高度特异性杀虫剂也引人瞩目（Harmar and Hom，1977；Nathanson，1985）。目前已知一些与章鱼胺受体有很强的亲和力且特异性很高的激活剂。其中特别是甲脒类（formamidines）（Harmar and Hom，1977）和苯胺叉咪唑类（phenyliminoimidazolidines）（Nathanson，1985）。这两类物质都有潜在的杀虫能力（Hollingworth and Johnstone，1983，1990）。在有GTP的条件下，以及在昆虫缺少镁离子的中脉内，这种结合位点与激活剂的亲和力就下降，说明结合位点是与1个G-蛋白耦联在一起的。

在果蝇头部分泌激素的部位，有一个能与标记的章鱼胺紧紧结合的位点，该位点需要GTP的参与活化，根据另一些药理学特征，可以估计这种受体也是章鱼胺环腺苷酶的一种（Dudai and Zvi，1984）。在东亚飞蝗体内，也观察到了类似的结合位点（Konings et al，1989；Roeder and Gewecke，1990）。Roeder等认为这种受体表现出了章鱼胺受体的所有药理学特征，而且神经组织内含量很高。但对章鱼胺受体的结构仍少有研究。蜚蠊血细胞内章鱼胺受体的脱敏现象也有发现。有两个研究小组曾独立地将受体基因克隆。但有人认为，克隆的并非章鱼胺受体，而是酪胺受体。

用$^3$H标记NC-52研究萤甲发光器（Nathanosn，1989；Nathanson and Kaugars，1989）和蝗虫的神经组织内的章鱼胺受体，结果发现，NC-52在可逆条件下可与蝗虫神经组织内的某一位点结合（Roedei and Nathanson，1993），这种结合与蝗虫神经组织内章鱼胺受体有相同的药理学特征（Roeder，1992；Roeder and Gewecke，1990）。在萤甲的发光器以及蝗虫的神经组织内，还发现一种类似章鱼胺的受体糖蛋白，可被特异性标记（Nathanson et al，1989；Roeder and Nathanson，1985），同时，还发现了蝗虫的章鱼胺颉颃剂，它与受体的亲和力很大。与章鱼胺受体具有高亲和力的颉颃剂和激活剂在发展特异性杀虫剂时很受人们的重视。因为这些杀虫剂在脊椎动物体内没有靶标，因此毒性很低。

## 3 酪胺及其受体

酪胺在昆虫的神经组织中的集聚程度相当高。但因为它是熟知的神经递质章鱼胺的前体，因此，它特殊的递质作用就被忽视了（Salker and Kerkut，1978；Saarvedra，1989）。不过，有关酪胺在昆虫体内的生理作用已有少量报道。在蜚蠊离体的脂肪体内，酪胺阻碍

葡萄糖的合成（Downer，1979）。蝗虫前、后肠肌肉内，章鱼胺明显受酪胺的影响（Huddant and Oldfielf，1982）。在蝇头部章鱼胺受体可与酪胺受体相互影响。酪胺对章鱼胺受体的亲和力也引起了人们的注意（Roeder and Gewecke，1990）。有趣的是，如果将章鱼胺与酪胺同时作用于昆虫时，则腺苷酸环化酶刺激兴奋的程度下降 50%（Uzzan and Dwdai，1982）。对这种现象的唯一解释是：存在一种酪胺受体，它可以抵抗章鱼胺对细胞的影响。已经证实的酪胺受体与腺苷环化酶是负耦联关系。Hen 研究小组已将果蝇酪胺受体基因克隆，指出了细胞内的表达信号（Sanduet et al，1990）。这种酪胺受体起初被错误地认为是章鱼胺的受体（Arakawa et al，1989）。如果出现了特异性表达，则酪胺就是这一受体的唯一具有高亲和力的兴奋剂。酪胺与这种受体的亲和力比章鱼胺高 40 倍左右。对这种受体的氨基酸序列分析表明，它的第 6 及第 7 个跨膜区域与脊椎动物的肾上腺激素受体具有同源性。当它与脊椎动物的 5-$HT_{1A}$受体、α-肾上腺素受体及果蝇的 5-$HT_1$ 受体相比较时，发现它们的序列有明显的同源性。但在脊椎动物体内并无直接的类似物。

据张宗炳（1986）报道，昆虫受到外界刺激时，可能在体内诱导产生酪胺，它对昆虫不利，因此是一种有毒物质。当昆虫在 DDT 一类化学物质的作用下，首先由心侧体产生章鱼胺，然后活化章鱼胺专一性受体，引起腺苷环化酶的增加。增加了的 cAMP 再诱导酪氨酸脱羧酶，最终会引起酪氨酸脱羧，大量酪氨积累。

一种存在于蝗虫神经组织的酪胺系统遍及蝗虫的整个脑部（Hiripi et al，1992）。突触的特定摄取酪胺方式以及其释放到组织液中的现象，表明蝗虫的神经组织存在有$^3$H－酪胺的结合位点。这种受体所表现的药理学特征与章鱼胺受体有显著的差异。与天蛾酪胺受体基因克隆试验中的表现一样，酪胺对这些结合位点的亲和力比章鱼胺强。育亨宾碱（yohimbine）是其具有极高亲和力的颉颃剂。这些研究都证明在蝗虫的神经组织内存在一种特殊的酪胺系统。将来的研究必将使我们对于昆虫神经组织内这种新出现的受体会有更多的了解。

## 4 多巴胺及其受体

多巴胺是一类典型的儿茶酚胺类神经递质。长期以来，人们都知道它是昆虫的神经活性物质。在昆虫的神经组织内，多巴胺的含量相当高。在蜜蜂的神经组织内，大约是章鱼胺的 2～3 倍（Harris and Woodring 1992）。利用传统的组织荧光染色法和免疫学方法，对多巴胺在细胞内的位置进行了研究。这种多巴胺的免疫活性广泛分布在昆虫体内，如神经组织内的触突一样分布到了所有主要的神经髓质内，说明它是一类重要的神经递质。在蜜蜂的脑内有 300 多个含多巴胺的神经元。蝗虫每个脑半球的 3 100 个左右的神经元中也有 300 个含有多巴胺（Wenedt and Honibery，1992）。但在蜜蜂的视叶内，却没有含多巴胺的细胞，可能是由于蜜蜂神经具有精巧的细胞和复杂多变的神经末梢，它的神经协调作用比神经递质更为有效。另外，除了多巴胺以外，与多巴胺合成有关的酶也存在于神经组织内，包括酪氨酸羟化酶（TRH）和多巴脱羧酶（DDC）。利用基因的特定位点的缺失突变对天蛾体内的 DDC 进行过详细的研究。然而对 TRH 的研究却没引起人们多大的注意。尽管如此，天蛾体内的一个 TRH 基因却早已得到了克隆（Weckarnyer and Quinn，1989）。

与上面所述的相比，我们对多巴胺在昆虫神经组织内的生理功能却知之甚少。昆虫神

经组织内的多巴胺和 5-羟色胺一样支配昆虫的唾液腺分泌（Brown and Nestier，1985），刺激神经及使用多巴胺都能引起神经的超极化和唾液的分泌。在蜜蜂中枢神经系内，多巴胺与嗅觉、学习功能有关（Bicker and Menzel，1989）。另外，有人认为释放多巴胺的神经元可能与昆虫的行为表现有关。位于蜚蠊腹神经节中的多巴胺与昆虫的排泄有关（Casagrand and Ritzman，1992）。将多巴胺作用于股神经节，会导致这些神经元之间的信号联合和传递（Casagrand and Ritzmann，1992）。把多巴胺注射到天蛾的中胸和注射章鱼胺一样引发某种飞行动作，但与 5-HT 相反，并不抑制天蛾的飞行。

利用不同的实验手段证明了昆虫体内多巴胺受体的特征。在天蛾、蚊子和蜚蠊体内发现了对多巴胺敏感的腺苷环化酶。在蜚蠊神经组织内，这类多巴胺受体与脊椎动物的多巴胺受体不同源。从多巴胺受体的药理学特征（表 7-2）来看，它与脊椎动物的多巴胺 $D_1$ 型受体很相似（Evans and Green，1990）、(Davis and Pitman，1991)。用〔$^3$H〕LSD（麦角酰二乙胺）标记蝗虫的两个受体结合位点，一个是 5-HT 受体，另一个是多巴胺受体。有一个 G-蛋白与多巴胺受体耦联在一起，但它所表现出的一些特点与脊椎动物多巴胺受体不同。说明与其他的无脊椎动物一样，不能用区分脊椎动物受体的方法来进行分类和定性。

**表 7-2　昆虫的多巴胺受体的生理学特征**（$K_I$ 值）

| | 蜚　蠊 | 蝗虫神经组织 $^3$H-LSD 结合位点 | 蜚蠊神经 cAMP 水平 | 蜚蠊神经联络神经元 | 专　性 |
|---|---|---|---|---|---|
| 儿茶酚胺 | 220 | 9.52 | — | >1 | $D_2$ |
| 氟哌啶醇 | 3 770 | 14 500 | 4.79 | 1 | $D_2$ |
| SCH2390 | 4 060 | 639 | — | 1 000 | $D_1$ |
| Metoclopramd | 246.700 | 2 470 | — | <100 000 | $D_2$ |
| 硫苯酰胺 | — | 21 200 | 308.6 | >1 000 | $D_2$ |
| 螺环哌啶酮 | — | 0.97 | 44.5 | >10 000 | $D_2$ |

表中 $K_I$ 值以 nM 计，数据来源：Evans and Green（1990），Degen et al，Orr et al，（1987），Pitman and Daries (1990)。

## 5　5-羟色胺及其受体

5-羟色胺（5-HT）在脊椎动物和无脊动物体内也是一类神经递质，它分布在昆虫体内的不同组织中，但以神经组织内的含量最高。昆虫的脑、腹神经索及心侧体都能合成 5-HT。

### 5.1　5-羟色胺的作用

利用 5-HT 的特殊抗血清研究，表明了昆虫体内产生 5-HT 的神经元及分布情况，尽管昆虫所含 5-HT 的神经元很少（在果蝇体内大约 100 个）。但这些神经元的树状突却伸展到昆虫中枢神经系统的整个网络中。昆虫脑中有些部分，如视叶中心体、触角神经以及蕈体内，都显示出极为显著的免疫特件，说明 5-HT 在这些部位有极其重要的作用。尤其是 5-HT 在视叶或触角神经中的位置，说明它在昆虫中枢神经中的作用不仅是神经调质，更重要的是神经递质。此外，也有人指出 5-HT 存在于美洲蜚蠊的血细胞中。

还有一些报道也支持5-HT是一种神经递质的论点。对5-HT的摄入有的是用整个昆虫的神经系来研究的，也有用蝗虫的体段来研究的。5-HT在吸血蝽的腹部神经血器官的神经末梢释放，需要有钙离子的辅助（Flanagan and Borlind，1984）。

5-HT在中枢神经的位点及外围神经系统中的协调作用，曾经以粉纹夜蛾的药物学反应系统进行过试验（Linna and Roelofs，1986）。在昆虫的中枢神经内，和大多数生物胺一样，5-HT也与学习和记忆活动有关（Bicker and Menzel，1989）。5-HT对章鱼胺调节记忆有颉颃作用。将5-HT注射到蜜蜂蕈体的不同部位，结果引起记忆的补偿能力下降。而且对章鱼胺和多巴胺在天蛾的飞行中所起的作用也有颉颃现象。红褐林蚁的行为变化与蜜蜂在受到分泌刺激后的反应一样，都与5-HT有关。据Cook和Ochard（1993）报道，在吸血蝽离体组织中，5.7-二羟基色胺（5.7-DHT）对5-HT有竞争性抑制作用，它影响5-HT的贮存和释放，这主要是合成作用受到抑制引起的。经5-HT处理的昆虫，经过2周后，才能恢复。说明神经元并不受损，吸血蝽取食正常，但其他行为受到影响。

5-HT可能减低磷酸化酶和增高磷酸酶的活性，通过细胞间隙中钙离子的浓度而发挥作用。因为钙离子是磷酸化酶的一种有效活化剂。在打破天蚕蛾的蛹滞育过程中，5-HT调控神经分泌细胞释放PTTH，从而使前胸腺释放蜕皮激素而引起成虫发育。利用生理学研究发现，5-HT能使蝗虫的神经去极化或超极化。在蝗虫的分离神经段内，5-HT能引起3种不同的反应，这些反应的离子机制及药理学特性都不相同。每种反应代表着一类受体（表7-3）。

**表7-3 昆虫神经组织内5-HT受体的 $K_1$ 值**

| | 5-HTdrol | 5-HTdro2A | 5-HTdro2B | $^3$H-5-HT 果蝇 | $^3$H-LSD 蝗虫 |
|---|---|---|---|---|---|
| 二氢麦角隐亭 | 0.013 | 0.001 1 | 0.038 | — | — |
| d-Butaelamel | 0.032 | 0.33 | 0.06 | — | 0.000 71 |
| I-Butaelamel | 31 | 14 | 30 | — | 3.58 |
| 哌唑嗪 | 9.8 | 0.25 | 0.18 | — | — |
| 二甲麦角新碱 | 1.2 | 1.4 | 0.72 | — | 2.43 |
| 育亨宾碱 | 32 | 18 | 9.8 | 0.04 | — |
| 8-OH-DPAT | 106 | 43 | 27 | — | 7.4 |
| LSD | 0.000 44 | 0.000 26 | 0.000 31 | — | 0.001 84 |
| 酪胺 | — | — | — | 0.7 | 3.6 |
| 螺环哌啶酮 | — | — | — | 无活性 | 1.64 |

表中数值以来nM计，数据来源：Saudou et al，(1992)，Dudai and Zvi (1984)，Wedemeyer et al，(1992)。二氢麦角隐亭（dihydroerganyptine）

对5-HT敏感的腺苷环化酶，在一些昆虫神经组织中也是作为5-HT受体存在的。5-HT刺激丽蝇唾腺分泌唾液，首先是增加cAMP的合成，同时也刺激细胞的钙离子流，并启动细胞顶膜的钾泵，使细胞底膜和顶膜的氯离子穿透性增加，因而提高胞外微绒毛间渗透压而促成唾液的外排。

## 5.2 5-羟色胺的受体

昆虫体内至少有4种5-HT受体。Hen已将果蝇的3种5-HT受体的基因进行了克隆。对这些受体的氨基酸序列比较表明，5-HT受体2个型（5-HTdrol和5-HTdro2B）之间有

很高的同源性（约 80%）。果蝇的 3 种 5-HT 受体与脊椎动物的 $5\text{-HT}_{1A}$型受体的同源性较 $5\text{-HT}_2$ 及 5-HTc 都要高许多（Sandou et al，1992）。因此，人们推测 5-HT 受体的两大亚单位在无脊椎动物与脊椎动物分化之前就有了（Hen，1992）。尽管 5-HTdorI 可以与腺苷环化酶很好的耦联在一起，但两种 $5\text{-HT}_2$ 型的受体却不能（Sandou et al 1992）。至少在一种昆虫的亚种群体内，5-HT 受体和腺苷环化酶非耦联性与生理学研究结果是一致的。如前面所述，5-HT 能颉颃一些与腺苷环化酶耦联的神经递质的活动，如天蛾飞行动力系统中的多巴胺。与蜜蜂的学习及记忆有关的章鱼胺及多巴胺也受 5-HT 的颉颃。昆虫体内除了一类与腺苷环化酶耦联的 5-HT 受体外，还有一种 5-HT 与磷酸酰胺酶系统耦联在一起遗憾的是，对这种受体尚无详细的研究。昆虫的色胺系统并没有脊椎动物那么复杂，但色胺受体的复杂程度似乎并不亚于脊椎动物。蝗虫体内能与$^3$H-LSD 结合的位点可能代表着另一类型的 5-HT 受体（Wedemeyer at al，1992）。众多的 5-HT 受体可能给人一种纷繁的感觉。但随着研究的深入，特别是那些将 5-HT 受体结构、位置与其生理功能联系起来的研究，将会使我们更好地了解 5-HT 的神经递质作用。

## 6 组胺及其受体

组胺（histamine）集中存在于昆虫的整个神经系统内，是一种很迟才发现的神经递质。昆虫的视杆周围存在组胺，但在神经组织内的含量并不很高（Elias and Evans，1983）。组胺在视觉路线上的生理作用已得到证实。假定某种物质具有神经递质的功能，它一定存在一种非活性状态。在昆虫的视网膜内通过一种特殊的摄入系统已得到了没有活性的组胺。如果把组胺作用于家蝇或蝗虫的视觉面上最前端的联络神经元时，就会引起酷似视网膜感光的反应（Simmons and Hardie，1988）。这种电反应表明了组胺有很复杂的特性。与脊椎动物脑内组胺受体 $H_1$、$H_2$ 不同，似乎都无相似的药理学反应特征。仅组胺处于低浓度时，非特异性的通道阻遏物才能抑制这种电反应。利用电压箝位技术，对这种生理反应作了更为深入的研究（Handie，1989）。结果表明组胺能使大的单极细胞的氯离子通透性上升。这种通透性的上升起因于氯离子通道的开放，时间可以持续 0.5ms（不包括将细胞内的信息传递给下一信使或 G-蛋白）（Hardie，1989）。一种类似的组胺受体似乎也存在于甲壳类动物的分泌系统中（McClintock and Ache，1989）。这类受体引起了人们的极大兴趣。因为它们具有一种脊椎动物受体所没有的特点，即直接能与离子通道耦联。

利用抗血清研究含有组胺的神经元在昆虫体内的分布（Nasselet at，1988，1990），结果发现，除了在昆虫的视网膜部位以外，昆虫的脑中也存在一些合成组胺的神经元。这些神经元的数目有限，但其树状突却伸到昆虫神经组织内的绝大多数部位（Nassel et al，1988，1990）。与甲壳纲及软体动物相比，昆虫中央神经系统内组胺的生理学方面的研究较少。在蟋蟀的经典试验中，组胺似乎是一种抑制型的神经递质（Skiebe et al，1990）将组胺注入蟋蟀前胸神经节内，导致听觉间神经元 ONI 的电生理学反应（Skiebe et al，1990）。半定量的药理学研究组胺 $H_1$-受体的典型特征表明，只有那些与脊椎动物的 $H_1$-受体有高亲和力的物质才有活性。这些物质的亲和力大小与蝗虫神经系统内$^3$H-mianserin 结合位点有相似的药理学特征（Roeder，1990;）。[$^3$H] -mianserin 能与一个受体紧紧结合，而且该受体表现的递质型的药理学特性（表 7-4），与脊椎动物的组胺 $H_1$-受体相似

(Roeder, 1990)。在蝗虫的视杆部位，有一种类似于$^3$H-mianserin 结合位点，它是一种与G-蛋白耦联的受体，且仅存在于神经组织内（Roeder et al, 1993)。在一种天然的清洁剂的帮助下，将这种受体溶解，对其分子量、糖蛋白特征等进行了研究。遗憾的是昆虫神经组织内的组胺腺苷环化酶仍未发现。另外，组胺对其他第二信息传递系统的研究也不详细。因此，至今，组胺对昆虫外围组织具有的生理作用仍不清楚，在神经传递中很多现象仍未揭示。

**表 7-4 昆虫组胺受体的药理学特征**（$K_I$ 值）

| 处理药剂 | 蝗虫神经组织<br>[$^3$H] -mianserin | 蝗虫的神经组织<br>[$^3$H] -mepyramin | 蟋蟀听神经系 |
|---|---|---|---|
| 异丙嗪 | 2.42 | 2.85 | + + |
| 杜克敏 | 5.81 | – | + + |
| 吡拉明 | 88.7 | 4 | – |
| 去郁敏 | 455 | - | + |
| 酚妥拉明 | 8 620 | 2 710 | |
| 西米令 | 265.000 | – | 0 |
| 组胺 | 1.03nM | 0.25nM | - |
| 章鱼胺 | 无活性 | 0.57mm | |

注：数据来源，Roeder (1990)，Roeder et al (1984)，Skiebe et al (1990)。$K_I$ 单位 nm 异丙嗪 (promethazine)，杜克敏 (doxepin)，吡拉明 (pyrilamine)，去郁敏 (desmipramine)，酚妥拉明 (phentolamine)，西米令 (cimetidine)

# 第八章 昆虫免疫防卫化学

昆虫是地球上出现最早、种类最多的动物类群。在生态系中占有重要位置，因而也成为许多猎食者和寄生生物攻击的靶标。同时，也是昆虫寄主防卫系统攻击的对象。在漫长的进化过程中，昆虫显然形成了一套有效的防卫体系。除了特殊的行为、拟态、保护色以及保护肌体的物理性屏障外，还具有清除体内异物的免疫系统、解毒酶系统，以及阻止猎食者的化学防卫毒素，借助生物化学的手段，保卫肌体，稳定肌体的内环境。

免疫是机体识别和清除体内异物，维持内环境稳定的一种特异生理反应。昆虫免疫系统与高等动物的免疫系统具有相似的生理功能，包括免疫防御（immunologic defence）：清除体内病原物、防止感染；免疫稳定（immunologic homeostasis）：清除体内衰老和损伤的细胞，维持机体的生理平衡；免疫监视（immunologic surveillance）：清除体内变异产生的异常（肿瘤）细胞，虽然这点在昆虫体内知之甚少，但目前尚未发现昆虫有肿瘤。昆虫免疫系统作为对生命周期短的小型生物的适应，与高等动物的相比有明显的不同。首先昆虫免疫系统没有明显的记忆功能，不能形成高等动物一次感染，终生免疫的生理现象；其次是昆虫免疫系统专一性不强，一种诱因诱导产生对多种异物的免疫反应。昆虫的这种免疫类似于高等动物的先天性免疫，而没有明显的获得性免疫。

## 第一节 高等动物的免疫系统

免疫系统是生物体内，由免疫细胞及相关组织器官组成的功能体系。随着免疫分子生物学的发展，这个功能体系还涉及到许多其他器官组织合成的功能分子。因此，免疫系统包括组织器

官、细胞和功能分子三个水平的互作。

## 1 免疫器官

免疫器官是免疫细胞发生、分化成熟、定居增殖以及产生免疫应答的场所。通常又将负责免疫细胞发生及分化成熟的器官叫做中枢免疫器官，而将免疫细胞定居增殖以及产生免疫应答的器官叫做外周免疫器官。前者包括骨髓、胸腺和鸟类的法氏囊，后者主要是淋巴结、脾脏和其他淋巴组织。骨髓不仅是高等动物的造血器官，也是重要的免疫器官。骨髓中的多能干细胞首先分化成髓样干细胞和淋巴干细胞，前者进一步分化成红细胞、单核细胞、粒细胞和巨核细胞系等；后者则发育为各种淋巴细胞的前体细胞。其中一部分淋巴干细胞分化为T细胞（Thymus dependent lymphocyte）的前体细胞，随血液流入胸腺后再发育为成熟的T细胞。在鸟类中另有一部分淋巴干细胞分化为B细胞（Bone marrow or Bursa dependent lymphocyte）的前体细胞，随血液流入泄殖腔背面的法氏囊，在那儿发育为成熟的B细胞，而在其他高等动物体内，B细胞等其他淋巴细胞是在骨髓内继续发育成熟的。成熟的免疫细胞可以随体液循环，但相当部分定居在外周免疫器官组织内，并在这里增殖产生免疫应答。

## 2 免疫细胞

凡参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞均可称为免疫细胞。在高等动物中，通常根据免疫细胞在免疫应答过程中所起的作用，将其分为辅佐细胞、淋巴细胞和其他免疫细胞3类。

### 2.1 辅佐细胞

是一些能够捕获和处理抗原，并能把抗原呈递给免疫活性细胞的一类免疫细胞。在高等动物体内主要包括单核吞噬细胞和树突状细胞。前者在骨髓中分化成熟进入血液，在血液中停留数小时或数日后，经毛细血管进入组织，分布在多种器官的结缔组织中，并分化成熟为巨噬细胞。血液中的单核吞噬细胞和组织中的巨噬细胞可以吞噬和杀灭多种病原微生物，以及处理清除衰老损伤的细胞，是机体非特异性免疫的重要因素。细胞表面的多种受体和主要组织相溶性复合体分子，使这类细胞的吞噬与杀伤作用能有效地接受抗体和补体因子的调理作用。同时，把处理的抗原物质转移至细胞表面，呈递给免疫活性细胞。此外，巨噬细胞还分泌多种蛋白水解酶、补体成分以及血浆蛋白，在免疫应答过程中释放的活性因子包括白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子和前列腺素。树突状细胞由骨髓中髓样干细胞分化而来，随血液流分布到各处的淋巴器官和组织中，细胞表面呈树突状，有较多的主要组织相溶性复合体分子，因而也有较强的抗原呈递作用，但这类细胞没有吞噬功能。

### 2.2 淋巴细胞

是个不均一的复杂细胞群体。包括许多具有不同免疫功能的亚群，主要有B细胞、T细胞、NK细胞和K细胞。它们在免疫应答过程中发挥核心功能作用，是高等动物体内数

量较多的细胞类群。B细胞在哺乳动物骨髓或鸟类的法氏囊内分化成熟，故称为骨髓依赖性淋巴细胞（bone marrow dependent lymphocyte）或囊依赖性淋巴细胞（bursa dependent lymphocyte），均简称为B细胞。B细胞在外周淋巴器官组织内定居和增殖，部分参与体液循环。其主要功能是接受抗原刺激、活化增殖、分化为浆细胞。由浆细胞产生能与特定抗原结合的特异性抗体，进行体液免疫。B细胞表面具有特征性膜表面免疫球蛋白（Surface membranc immunoglobulin，SmIg），能识别和结合特异性抗原，使细胞活化增殖，产生免疫应答。此外，B细胞表面还有多种其他表面受体及活性分子，进行不同信息传递。B细胞的分化成熟实际上包括两个阶段：第一个阶段是不依赖抗原刺激的骨髓内分化阶段，随着膜免疫球蛋白基因的表达，由淋巴干细胞，经前B细胞，幼稚B细胞到成熟B细胞；第二阶段是依赖抗原刺激的外周分化阶段，主要是接受抗原刺激后，进一步分化为产生特异抗体的浆细胞。在B细胞的分化过程中，未完全成熟的幼稚B细胞，能接受细菌脂多糖、荚膜多糖、聚合鞭毛素等非胸腺依赖性抗原的刺激，产生M型免疫球蛋白，为机体提供免疫耐受性，但这种免疫应答没有记忆功能，被称为B1细胞，而成熟的B细胞相应被称为B2细胞。B2细胞需要T细胞的辅佐，接受胸腺依赖性抗原刺激后活化增殖，并且分化为浆细胞，在产生体液免疫的同时，产生一部分免疫记忆细胞，这些长寿的记忆细胞在机体随后再次遭遇相同抗原侵染时，可直接活化，产生免疫应答。

T细胞是由骨髓分化产生的前T细胞进入胸腺后分化发育成熟的，故称为胸腺依赖性淋巴细胞（Thymus dependent lymphocyte），简称T细胞。成熟的T细胞经血流分布到外周免疫器官定居增殖，部分随体液循环游走于全身各处。T细胞主要是接受抗原刺激活化，增殖并分化成效应T细胞，负责细胞免疫功能．所有T细胞表面均具有识别和结合特异抗原的T细胞抗原受体。此外，还有大量表面抗原及其他表面分子，进行信息通讯以便调理免疫应答。根据T细胞的表面抗原和功能差异，将其分为5个亚群：辅助性T细胞，有协助B细胞产生抗体以及其他T细胞分化成熟的功能；诱导性T细胞，能诱导辅助性T细胞和抑制性T细胞的成熟；抑制性T细胞，能抑制B细胞产生抗体，也能抑制其他T细胞的分化增殖；迟发型超敏反应性T细胞，能释放多种淋巴因子，导致炎症反应，发挥排除抗原的作用；细胞毒性或杀伤性T细胞，识别带有抗原的靶细胞，接触后释放穿孔素使靶细胞溶解。前三类相互调节制约，对免疫应答起调节作用，称为调节性T细胞；后两类在效应阶段发挥作用，称为效应性T细胞。这里还应指出，T细胞接受抗原刺激，在增殖分化产生免疫应答的过程中，也产生长寿的记忆性T细胞，它与记忆性B细胞是机体获得性免疫的基础。

NK细胞和K细胞的细胞表面既没有B细胞的膜表面免疫球蛋白、也没有T细胞的表面抗原受体。NK细胞即自然杀伤细胞（natural killer cell），是一群不依赖抗原刺激和致敏，也不需要抗体参与就能杀伤靶细胞的淋巴细胞，主要存在于外周血和脾脏中，细胞表面也有识别靶细胞的表面分子，但结构尚不清楚。此外，也有一些受体在免疫调理中发挥作用。K细胞即杀伤细胞（Killer cell），能识别并杀伤所有与抗体结合的靶细胞。因而对抗体识别结合的靶细胞起作用。NK和K细胞在体内常维持一定数量范围，而不是像B细胞和T细胞等免疫活性细胞，因抗原的刺激后急剧增殖，它们体现了机体的先天免疫能力。此外，还有一些细胞，如粒细胞在免疫应答后期，可在趋化因子等作用下，发挥作

用。

## 3 免疫分子及其功能

凡参与免疫应答的体液因子均可称为免疫分子。主要由免疫细胞产生，包括免疫球蛋白、补体系统和细胞因子三大类。

### 3.1 免疫球蛋白（immunoglobin，Ig）

是一类具有抗体相似化学结构的球蛋白。抗体是功能定义，所有抗体均是 Ig。而 Ig 是化学结构概念，并非所有 Ig 都能与抗原发生特异性结合，表现出抗体活性。Ig 的基本结构是由二硫键连接两条重链和两条轻链形成的 Y 型分子单体。用木瓜蛋白酶水解 Ig，可获得两个相同的 Fab 和一个 Fc 片段。Fab 即抗原结合片段，含有一条完整的轻链和重链 N 端的一部分能与一个抗原决定簇形成特异性单价结合，而 Fc 片段具有活化补体，以及与免疫细胞表面受体结合的能力。Ig 的重链和轻链均有一定的易变区和恒定区，它们是由一系列的基因（肽段）随机组合表达形成的。在 Ig 基因库中有几百个易变区基因（V）和众多的多样性基因（D）及连接基因（J），这些基因在 B 细胞分化成熟时可随机组合表达。此外，V-J 及 V-D-J 重组时，连接处的碱基位移、切除与整合，使超变区多样性成数量级上升。Ig 的 Fab 片段在重链和轻链的组合上也导致抗体特异性类型成倍增加。这样 Ig 基因库就能适应最大量变化的需要，合成数以亿计的不同抗体。这里应该指出的是 B 细胞在表达 Ig 基因时，存在等位基因排斥现象，也即只表达其中 1 个等位基因。1 个 B 细胞及其分化增殖的细胞株系合成的抗体，重链、轻链、可变区独特型，以及抗体特异性、亲和力、生物学性状及分子结构完全相同。抗体的主要功能是与抗原结合，进行异物标记与纯化，同时激活免疫系统产生免疫应答反应。

### 3.2 补体系统（complement system）

是由一系列血浆蛋白（酶）组成的功能系统。补体系统的蛋白大都来自免疫细胞，如巨噬细胞、脾、淋巴组织、骨髓，此外还有小肠上皮细胞、肝、肺、肾等。根据其发现先后顺序，通常将补体系统的功能单位命名为 $C_1$、$C_2$、$C_3$……$C_9$。$C_1$ 是 1 个借钙相联的巨分子复合体，其 6 个球部顶端都具有与抗体 Fc 片段相结合的受体。当抗体与抗原结合后，Fc 片段的结合部位因分子构型改变而暴露，从而与 $C_1$ 的 Fc 受体结合，引起 $C_1$ 分子构型改变，并表现出酯酶活性，从而完成对异物识别。此时的 $C_1$ 分子可以使 $C_4$ 分解释放出 $C_4b$ 分子，$C_4b$ 有暴露的不稳定部位，能迅速与靶细胞膜结合，随后引发补体系统一系列的链级反应，形成疏水性复合物，并选择性插入靶细胞膜内，自发聚合形成贯通靶细胞膜的管状孔道，导致靶细胞溶解。这是体液免疫补体系统导致靶细胞溶解的经典途径。

### 3.3 细胞因子（Cytokines）

是指免疫细胞受刺激后产生的、既非抗体又非补体、具有激素活性、在免疫应答和炎症反应中产生多种生物学功能的低分子量、分泌性蛋白质，主要包括干扰素（interferon）、白介素（interleukin）、集落刺激因子（Colony stimulating factor）和肿瘤坏死因子（tu-

mour necrosis factor）4 类。其中集落刺激因子的主要功能是刺激免疫前体细胞的分化成熟。干扰素则能使敏感细胞产生抗病毒蛋白，提高多种免疫细胞的功能活性，诱导产生白介素等，因而具有抗病毒、免疫调节和抗肿瘤等多种功能。白介素是一组在免疫细胞活化、增殖和分化中起调节作用的细胞因子，目前已发现 10 多种。肿瘤坏死因子具有广泛的免疫调节和免疫效应功能，既能杀伤肿瘤细胞又能诱导细胞产生多种免疫调节因子。此外，还有一些先天性正常生理组成的抗菌物质，如溶菌酶等。

## 4　免疫防御

就昆虫免疫系统的功能，研究最多的就是免疫防御。为了相互比较，这里我们重点总结一下高等动物抗感染免疫的机制。高等动物的抗感染免疫包括先天免疫和获得性免疫两大类。

### 4.1　先天免疫

是有机体在种系演化过程中逐步建立起来的一系列天然防御功能，可遗传给后代。这些免疫机制通常对多种病原侵染都有作用，因而又被称为非特异性免疫，主要包括①屏障结构。如皮肤黏膜、血脑屏障和胎盘屏障，有阻挡和排除微生物等异物的作用，一些腺体分泌物还具有杀菌的作用。②体液中的抗微生物物质。如补体、溶菌酶、乙型溶素、干扰素等，对感染微生物具有抑制、杀灭和溶解的作用。③吞噬细胞。主要有两类，即中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等小吞噬细胞，和单核吞噬细胞及巨噬细胞等大吞噬细胞。它们通过趋化接触、调理、吞入、杀菌、消化清除病原微生物。接触可以是随机的，也可以是趋化因子诱使的趋化作用。主要趋化因子包括补体活化片段、某些外源物的成分或产物、活化的免疫细胞及其释放的细胞因子。吞噬细胞与病原物接触的吞噬，取决于病原物的性质及其他因子的调理作用。一般抗体和补体降解的片段能与病原物结合，同时与吞噬细胞表面结合，促进吞噬作用。这些作用于细菌使之易于被吞噬的物质被称为调理素。高等动物杀死吞噬细胞内的细菌涉及到两种方式，其一是无氧条件下利用酵解产生的酸、溶菌酶、乳铁蛋白和阳离子蛋白直接破坏和杀死细菌，在有氧条件下则主要利用过氧化物酶——$H_2O_2$—卤素系统，通过氨基酸氧化脱羧形成有毒的醛类、单氧基，并使细菌胞壁卤化，杀死吞入的微生物。在没有过氧化物酶参与时，也可利用有氧代谢产生的 $H_2O_2$、$O_2$、单氧基和游离羟基直接杀死细菌，或通过脂质过氧化分解核酸等杀死细菌。也有一些细菌，如麻风杆菌、结核杆菌等在免疫力低的人体内，虽被吞噬但不被杀死，甚至在吞噬胞内繁殖并游走全身，这种现象被称为不完全吞噬。

### 4.2　获得性免疫

是个体在生活中接触某种病原物及其产物后产生的特异性体液免疫和细胞免疫。由于在免疫应答过程中产生的记忆性长寿 B 细胞和 T 细胞，可以使机体获得终生免疫，但不遗传。其中体液免疫主要是指抗体的中和作用、抑制作用，以及与补体和细胞的联合作用。机体接受抗原刺激后可以产生特异性抗体，这些抗体中有些能与相应的病毒结合，阻止病毒吸附于易感细胞或穿入细胞内，防止扩散和再侵染。还有一些可与细菌素或类毒素

结合，直接影响毒素的活性中心，而使之失去毒性作用。抑制作用包括机体分泌的黏膜表面分泌性球蛋白A，阻止病原体的吸附，抑制其侵入以及一些抗体通过结合抑制病原体的酶系统或代谢，抑制其生长繁殖。联合作用则包括由抗原抗体结合、激活补体系统的溶菌作用，以及由抗体调理作用，刺激免疫细胞的吞噬功能。细胞免疫主要是指细胞毒性T细胞对靶细胞的杀伤作用，以及其他效应T细胞合成释放多种淋巴因子而发挥的抗感染免疫作用。

## 第二节 昆虫的免疫系统与功能

昆虫的免疫系统与高等动物相似，也包括阻止异物侵染的体壁、消化道等物理性屏障，体腔内的细胞防卫和多种具有免疫功能的抗菌肽组成的体液免疫。但昆虫没有高等动物分化如此明显的免疫器官。昆虫的免疫组织器官主要是血淋巴和造血器官。昆虫的体腔即血腔，所有的组织器官均浸浴其中。昆虫的血细胞来自胚胎发育时的中胚层细胞，在个体发育过程中，血细胞的增补依赖于血细胞的分裂分化和造血器官中增殖释放的血细胞。昆虫的血细胞没有高等动物输送氧的红细胞，大都与免疫功能有关。外源异物侵入可以刺激血细胞数量增加，但不产生特异性效应细胞和记忆细胞。细胞免疫主要包括吞噬、包被成瘤和凝集作用。昆虫体液免疫与高等动物有明显差异，主要是没有抗体和补体系统。但近年来研究发现许多具有免疫功能的多肽类物质（详见第九章）。其中不少具有高等动物免疫分子类似的功能，它们主要由血细胞和脂肪体合成，并与血细胞一起组成昆虫体内免疫的功能体系。

### 1 昆虫免疫系统对外源异物的识别

对异物的识别是免疫系统的重要一环。昆虫没有抗原——抗体识别机制。但利用异源和同源物进行的移植试验表明，昆虫也同样具有识别异物的监视机制。目前较清楚的主要是类似高等动物对非胸腺依赖性抗原的识别，也就是对侵入微生物细胞表面特有的物质进行识别。如肽葡聚糖（Peptidoglycan）、脂多糖（lipopolysaccharid）和β-1,3-葡聚糖（β-1,3-Glucans）。给家蚕和烟草天蛾注射细菌或肽葡聚糖，均能有效诱导脂肪体合成溶菌酶（lysozyme）、天蚕素（cecropins）和血素（hemolin）等血淋巴抗菌蛋白，说明昆虫脂肪体上具有识别肽葡聚糖的受体。另一类能刺激合成血淋巴抗菌蛋白的细菌胞壁物质是脂多糖。从昆虫血淋巴中分离出几种能与脂多糖专一结合的血淋巴蛋白，它们可以起到识别革兰氏阴性菌的作用。在蜚蠊血淋巴中分离到的两种凝集素（Lectin）均能与脂多糖结合，它们都是由10～30个相同亚基组成的聚合体，亚基分子量在$28\sim30\times10^3$u，在氨基酸序列上与脊椎动物识别微生物的C型凝集素类似。在家蚕体内粒血胞（granular）表面有1种分子量为$11\times10^3$u的表面蛋白，可与脂多糖形成特异结合，这种结合并与该类细胞1种抗菌蛋白天蚕素的基因表达有关。在地中海实蝇幼虫体中发现某些血细胞膜表面有分子量为$47\times10^3$u的脂多糖联结蛋白。这种联结与胞间蛋白磷酸化有关，可能是血细胞识别脂多糖和信息传递的渠道。β-1,3-葡聚糖是真菌细胞壁的重要组成，目前已从家蚕和小龙虾体内分离出其专一性结合蛋白、对其cDNA序列分析发现，这些蛋白的结合可能启动酚

氧化酶对真菌的反应。

此外，在昆虫体内还发现一些与外源物质结合启动免疫反应的其他活性因子，包括凝集素、血素等。凝集素是1种可和细胞表面寡聚糖相结合的蛋白质，由于其多个结合位点的存在，可以导致靶细胞的聚合。这类蛋白质已在多种昆虫中发现并分离，通常是多聚体(分子量在$70\sim150\times10^3$u)，其亚基分子量为$30\sim40\times10^3$u。在家蚕中分离到较特别的凝集素，这个蛋白类似于高等动物血小板凝集因子，其合成的前体为$343\times10^3$u，而后转化成$280\times10^3$u的成熟蛋白，内含哺乳动物甘露糖结合蛋白的相似片段，可由注入肽葡聚糖、脂多糖和大肠杆菌刺激合成，在家蚕变态发育时也出现。在天蚕蛾和烟草天蛾体内分离到的血素，是1个含有重复免疫球蛋白序列的蛋白质，分子量为$47\times10^3$u，一般血淋巴中含量极低，注入细菌后可激发其合成并使之达到1～7mg/ml的浓度。这种蛋白黏着到细菌或细胞表面，可刺激血细胞的吞噬。在果蝇体内也发现与哺乳动物吞噬细胞受体活性一样的蛋白质，可以调节血细胞的吞噬作用。因此，昆虫虽然没有抗体——抗原识别机制，但仍有一些类似高等动物辅助细胞对异物识别或免疫细胞对非胸腺依赖性抗原的识别机制，依赖体内特定的受体蛋白的结合，启动免疫反应。此外，昆虫血细胞也同样具有清除衰老细胞或其碎片的功能。因此，也肯定存在对正常细胞和异常细胞的识别功能。但目前尚未报道昆虫血细胞具有类似高等动物血细胞的表面复合体。

## 2 昆虫的细胞免疫

昆虫的血细胞来源于中胚层细胞。利用光镜、染色甚至电镜对昆虫血细胞的分类已有很久历史，但一直没有彻底弄清血细胞的具体种类。目前利用抗体的研究有明显的进展，但在不同昆虫中还没有发现血细胞类型特有的标致性抗原。一般认为原血胞是昆虫体内最基本的血细胞，其他血细胞均由其分化而来，原血胞还具有分裂增殖的能力。浆血胞、粒血胞和凝血胞是免疫反应中最重要的血细胞，其形态、功能均有明显不同。它们通过循环运动接触异物，而后通过特定的功能分子识别结合而产生防卫反应，对不同的侵入物或异物形成吞噬、凝集成瘤或包被作用。

吞噬作用通常发生在少量小型寄生物的侵入之后，是一种受体调节的免疫反应，由粒血胞和浆血胞完成。其吞噬过程涉及到细胞内微管的形成，因而细胞分裂抑制素B(cytochalasin B)可抑制吞噬作用。而微生物源的一些多糖因子，以及昆虫体内酚氧化酶原活化过程可以刺激血细胞吞噬作用，可能是受体识别和调理的重要活性分子来源。成瘤作用是当大量小型微生物侵入后，导致血细胞、血浆物质及异物凝集，而后被血细胞包被的免疫过程。脂多糖、Zymosan、laminarin及糖蛋白均有刺激启动包被的功能，而在不同昆虫中接受刺激产生的抗菌蛋白或凝集素均可起到粘着细菌和血细胞及凝集物的作用。包被作用是昆虫血细胞对大型异物的免疫反应，包括细胞包被和血液两种。前者如鳞翅目昆虫，首先由粒血胞或浆血胞识别后，释放出信息物质，吸引其他浆血胞围聚包被，而后内部黑化或不黑化。后者如双翅目，由血细胞识别后溶解释放信号分子，形成黑化的体液物质包被，而后再由细胞包被或不包被。这些大型寄生物可以通过改变外衣，分泌物的特性，或在侵入时同时带入病毒，破坏寄生的识别、黏着或包被，从而建立寄生关系。

显然在细胞免疫过程中，除了识别信号外，黏着分子也是1个重要因子。目前已发现

许多昆虫血细胞黏着分子，它们均具有 Arg-Gly-Asp（RGD）的氨基酸序列结构，这是整合蛋白家族的特征结构，与其他生物和细胞黏着分子，尤其是黏连蛋白的结构完全一致。而血素、脂载体和血细胞凝集抑制剂则是阻止血细胞凝集的调节因子。这两类正反调节因子是细胞免疫功能的保证。

昆虫血细胞免疫反应受到许多控制正常生理的内源因子的调控。一般来说，昆虫蜕皮变态是最易受感染的时期。在长期的演化过程中，昆虫形成了利用蜕皮变态激素调节免疫的机制，这在研究中已有不少实例。家蚕在蜕皮变态时其体内粒血胞对鹅血红细胞的附着和吞噬能力明显加强，果蝇蛹发育期间浆血胞变成片状的包被细胞，用 20-羟基蜕皮酮处理果蝇血细胞，能刺激提高对异物的吞噬率。此外，昆虫血细胞的免疫功能还受其他内源因子的影响。在烟草天蛾体内发现，抑制十二烷酸的合成，就会降低其清除血淋巴中细菌及成瘤作用的能力。由于哺乳动物体内的氧化二十碳四烯酸和其他多烯酸都具有红细胞趋性，因而推测十二烷酸在昆虫体内也可能具有血细胞趋性。在美洲蜚蠊和大蜡螟体内发现 5-羟色胺和章鱼胺等生物胺都能增加血细胞吞噬作用和成瘤作用，以清除血淋巴中微生物。由于生物胺受体多与腺苷酸环化酶相偶联，因而推测这一过程可能是通化环腺苷酸调节的。昆虫中还可能存在类似脊椎动物细胞激动素的活性物质，它可以直接调节血细胞和其他免疫细胞的功能。目前已在无脊椎动物中发现，而昆虫中浆血胞破裂因子在某些昆虫中最可能发挥这一作用。

## 3 体液免疫与抗菌肽

昆虫体液免疫依赖血淋巴中的抗菌肽和蛋白。它们主要由脂肪体、血细胞、围心细胞、马氏管、中肠以及受伤或受感染时的真皮细胞合成。目前发现抗菌活性物质的作用机制主要有 4 个方面：酶促水解破坏微生物的细胞壁；直接插入细胞膜破坏膜结构及其透性；抑制微生物的物质代谢，尤其是外膜组分的合成，阻止细胞分裂繁殖；代谢产生细胞毒性物质，使外源物被杀死或钝化。

### 3.1 水解破坏微生物细胞壁

典型的是溶菌酶（lysozyme）。这种酶是昆虫体内的正常组分，但可受异物诱导而大量增加。它主要通过水解细菌胞壁物质，粘多糖中的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 β-1，4 键发挥抗菌作用。目前已从家蚕、烟草天蛾和果蝇等昆虫中克隆出了溶菌酶的基因，所有的这些溶菌酶的分子量均为 $14\times10^3$u，其序列与鸡蛋清溶菌酶相似。但在不同的昆虫中，溶菌酶所起的作用可能有一定差异。研究发现，家蚕体内溶菌酶极易受细菌诱导，且主要由脂肪体合成，而果蝇体内的则不受细菌诱导，主要由中肠细胞合成，起正常的消化作用。

### 3.2 直接破坏细胞膜的通透性

在昆虫体内分离到的许多抗菌肽大都具有直接破坏微生物细胞膜结构、影响胞膜透性的作用。如在双翅目、鞘翅目、膜翅目和蜻蜓目昆虫中发现的昆虫防卫素（Insect defensins）为 29～34 个氨基酸的多肽，内含 6 个半胱氨酸，在分子内形成 3 个二硫桥。利

用核磁共振研究发现，分子的 N 端有一个环，紧接着为短 α 螺旋，并通过二硫桥与 C 端的 β 片层结构相联，形成 α—β 复合结构。其主要作用是通过聚合形成插入膜内的通道裂解革兰氏阳性菌的内膜。天蚕素是另一类基因结构的抗菌肽，最初在天蚕蛾中分离得到，分子量为 $4\times10^3$u，对革兰氏阴性和阳性菌具有广泛活性。目前在鳞翅目和双翅目昆虫中均有报道，均为立体结构相似的阳离子多肽，并在分子内形成两个脂水两亲的螺旋区，这种两亲性分子与细胞膜脂互作是破坏膜结构，进而溶解细菌的主要原因。

### 3.3 阻止细胞分裂增殖

在鳞翅目、双翅目等昆虫体内分离到的 $20\sim28\times10^3$u 的抗菌蛋白，可以由细菌诱导产生。从其基因序列分析，这些蛋白属于肉毒素 Ⅱ 家族（attacin/sarcotoxin）Ⅱ Family)，它们主要通过抑制外膜蛋白的合成而阻止革兰氏阴性菌的细胞分裂和繁殖。另外，仅在双翅目昆虫中分离到的分子量为 $9\times10^3$u 的抗菌肽—蝇素（diptericins)，其结构序列与肉毒素碳端的富甘氨酸区相似，仅对部分革兰氏阴性菌起作用，其作用机制也是抑制外膜蛋白的合成。

### 3.4 代谢毒物的杀伤与钝化作用

昆虫酚氧化酶是一个重要的免疫防卫因子。最初发现，由于酚氧化酶将酪氨酸代谢并氧化成醌，醌类再聚合形成黑色素沉积在伤口或包被的异物周围，形成黑化反应。随后研究在多种昆虫中证实，黑化反应是一个重要的免疫防卫反应。其一是酚氧化反应过程有利产生各种过氧化自由基和羟基自由基，这些物质表现出极强的细胞毒性，可以直接杀死侵入的微生物。其二是氧化产生的醌类和黑色素，可使蛋白质鞣化，因而可钝化微生物，阻止其在体内扩散漫延。此外，酚氧化酶及其活化过程中的产物，在免疫过程中还可能存在识别和启动其他免疫过程的作用。

近年来，由于酚氧化酶在多种昆虫中的分离纯化，使其功能研究取得很大进展。酚氧化酶以酶原形式存在于血液和血细胞中，在有的昆虫中发现表皮和中肠细胞中也存在。酶原经专一性丝氨酸蛋白酶水解一段肽链而活化。酶原正常情况下在昆虫体内以二聚体存在，含有两个大约为 $80\times10^3$u 的亚基。昆虫中的亚基有不同的类型。不同类型亚基的序列 40%～50%是相同的，它们在昆虫体内形成异型二聚体。在分子生物学水平研究酚氧化酶分子序列发现，它属于一个包括节肢动物血蓝素蛋白（Hemocyanins）和昆虫血淋巴 6 亚基血浆蛋白（Hexameric Hemolymph Proteins）在内的超基因家族，每个酚氧化酶亚基内含有两个与血蓝蛋白铜结合部位相对应的保守序列。此外，亚基内还含有一个类似于脊椎动物补体蛋白 $C_3$ 和 $C_4$ 以及 α-巨球蛋白硫酯区的序列。这些区域的水解将会导致分子与其他配体的共价结合，还可能是酚氧化酶在凝集过程中表现出粘着作用的原因。

## 4 抗菌肽的基因表达调控

昆虫抗菌肽的基因表达调控与哺乳动物基本相同。首先在许多昆虫的抗菌肽基因的上游区域，发现了类似哺乳动物基因转录因子（NF—kB）结合部位相同的碱基序列。同时也分离到结构与活性均类似于 NF—kB 的活性蛋白。如天蚕蛾和果蝇的免疫基因上游均有

NF—kB结合调控的碱基序列，在天蚕蛾体内还发现一种核蛋白，被称为天蚕蛾免疫反应因子（CIF），其功能及分子大小均与NF—kB相似，同时可被细菌感染而诱发合成。在果蝇中，除了发现一种可直接与NF—kB调控区碱基序列相结合调节免疫基因表达的因子外，还发现一种可与一种特定的膜受体（Toll）相结合的调控因子（dorsal）。Toll是一个与高等动物白介素1受体相类似的膜受体，dorsal首先与另一蛋白因子形成复合体，当与受体Toll结合时，复合体解离释放出一个蛋白因子，而后dorsal进入膜内，与NF—kB结合区的碱基序列结合，发挥转录因子的作用。目前已有不少报道认为，这一机制控制果蝇体内天蚕蛾素基因转录的启动。此外，果蝇体内蝇素基因除了具有NF—kB结合序列外，还存在一个哺乳动物基因相同的序列位点GAAANN。在哺乳动物体内，干扰素调控因子（IRF1）可以与这一位点结合调控基因的转录。在果蝇脂肪体和血细胞中发现了一个$45\times10^3$u的多肽，可以与这一位点结合。这种结合在细菌感染时明显加强，而且这一蛋白与IRF1的多克隆抗体有交叉反应。因此，昆虫抗菌肽基因表达调控可能涉及到多个机制。目前发现的两种均类似于哺乳动物的白介素和干扰素调控机制。这也说明昆虫体内同样存在多种免疫调节因子。目前这方面的研究将进一步揭示昆虫的免疫调控体系。

研究昆虫免疫防卫有利于有害生物和媒介昆虫的治理以及人类对抗菌物质的开发利用。近几年来，人们已从鳞翅目和双翅目昆虫中分离出了大量的抗细菌蛋白和肽类活性物质。随着研究的深入，其他目昆虫，尤其是微生物侵染压力不同的各种昆虫的研究，将会提供更丰富的昆虫免疫知识，目前也已开始研究昆虫抗真菌类物质。但总的来说，由于昆虫种类和生物学的复杂性，虽然习惯上认为昆虫的免疫系统较简便，但不同昆虫的总体表现要复杂得多。所以，研究昆虫免疫需要更多的模式昆虫，而对血细胞反应的细胞生物学和生物化学，血细胞类型的标记分子及功能分子的单克隆抗体筛选，昆虫免疫识别，粘着和细胞毒杀机理，免疫细胞和组织间的通讯机制和信号物质，以及免疫活性物质基因表达的调控等方面的研究，都将会是这一领域的研究热点，并成为知识成果不断涌现的重要前沿。

## 第三节 抗菌肽之间的协同

在同1种昆虫中存在着几类不同性质的抗菌肽。由于昆虫中不存在像高等动物那样的记忆免疫（如B-和T-细胞），故当遭受微生物侵染时，各种抗菌肽总是先后翻译，共同存在于血淋巴之中，长期的生物进化过程必然使这些抗菌成分能协同表达。这种协同表达不仅使昆虫体液的抗菌谱很广，而且对产生抗性的微生物，不同抗菌肽多靶标攻击也可最终将其杀灭，达到成功防御的目的。充分了解其协同表达，不仅是深入理解昆虫免疫必需的，而且这种协同表达也为医学上抗生类药物的联合使用提供了思路。

昆虫抗菌肽协同表达的方式随不同昆虫而异。在惜古比天蚕蛾中，天蚕素、天蚕抗菌肽（attatin）和溶菌酶非常专化，分别破坏细菌表层的3层包被，对于细菌的杀伤力彼此之间具有显著增效作用。在蜜蜂中，存在于血淋巴中的4种抗菌肽蜜蜂抗菌肽（apidaecin）、蜂蛾抗菌肽（abaecin）、防卫素和膜翅抗菌肽（hymenoptaecin）具有各自的抗菌谱，对不同的菌种专化性不同，共同释放后抗菌谱非常广，故蜜蜂血淋巴中的抗菌肽的协

同方式为活性互补。

越来越多的证据表明，昆虫遭受细菌攻击后，导致昆虫中很多免疫基因激活。这一激活过程由普遍存在于生物界的 NF-kB/IkB 相似机制引发，这一机制在哺乳动物急性期反应或炎性反应表达。昆虫免疫基因表达后，产生的效应物即抗菌肽前体需经过一系列翻译后加工，才能成为有生物活性的抗菌肽。如膜翅抗菌肽、蜜蜂抗菌肽和防卫素前导序列尽管差异很大，但都具有 RRXR 序列。在哺乳动物中，具有两个碱性氨基酸的位点至少是 2 种高度专化的内切酶的加工位点。因此，蜜蜂的这 3 种抗菌肽均具有复杂的翻译后加工。

这些研究表明，抗菌肽之间的协同是十分复杂的，具有增效协同、基因表达协同和翻译后加工协同等多种方式。

## 1 昆虫体内的抗菌肽类

遭受免疫攻击的鳞翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目和半翅目昆虫，其血淋巴中形成的抗菌肽非常复杂。其复杂性表现在两个方面：①大多数鉴定过的昆虫都具有多类抗菌肽，其中类型最多的包括 4 种。如惜古比天蚕蛾包括天蚕素、大蚕蛾抗菌肽、溶菌酶等；麻蝇包括麻蝇素Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和麻蝇防卫素；果蝇包括天蚕素、双翅抗菌肽等。有的昆虫包括 3 种或 2 种类型。②每 1 类中又有变异程度较小的若干种抗菌肽。如惜古比天蚕蛾的天蚕素包括 A、B 和 D；麻蝇素Ⅰ包括 A、B、C 和 D。因此，昆虫血淋巴中抗菌肽的种类较多，组成了联合的防御体系（表 8-1）。

**表 8-1 不同昆虫中已鉴定出的抗菌肽种类**

| 目 | 种 名 | 抗 菌 肽 种 类 |
|---|---|---|
| 鳞翅目 | 惜古比天蚕蛾 | 天蚕素（cecropin A、B、D）、天蚕抗菌肽（attatins）溶菌酶（lysozyme）、血液素（hemolin） |
| | 家蚕 | 天蚕素（cecropin A、CM4、CM4ph）、蠋肽（lebocins） |
| | 烟草天蛾 | 杀菌肽（bactericidins、与 cecropin 类似） |
| 双翅目 | 麻蝇（*S. peregrina*） | 麻蝇素Ⅰ（Sarcotoxin ⅠA、B、C、D）、Ⅱ、Ⅲ和麻蝇防卫素（sapecin） |
| | 绿蝇（*P. terranovae*） | 双翅抗菌肽（dipteracins）、防卫素（defensins） |
| | 黄猩猩果蝇 | 天蚕素 A1、A2、B、抗菌肽、果蝇防卫素（drosomycin）、果蝇抗菌肽（drosocin） |
| 膜翅目 | 意大利蜜蜂 | 蜜蜂抗菌肽（adipaecin）、蜂蛾抗菌肽（abaecin）、膜翅抗菌肽（hymenoptaecin）、防卫素（defensin） |
| | 欧洲熊蜂 | 蜜蜂抗菌肽（apidaecin）、蜂蛾抗菌肽（abaecin）、防卫素（defensin）、膜翅目抗菌肽（hymenoptaecin） |
| 鞘翅目 | 粉甲（*Z. atratus*） | 鞘翅抗菌肽（coleoptericin）、防卫素（defencin） |
| 半翅目 | 碧蝽（*P. prasina*） | 防卫素（defensin）、梅氏抗菌肽（metalnikowins） |
| | 红蝽（*P. apterus*） | 防卫素（defensin）、红蝽抗菌肽（pyrrhocoricin）、半翅抗菌肽（hemiptericin） |

## 2 抗菌肽抗菌谱上的协同表达

### 2.1 蜜蜂抗菌肽

存在于蜜蜂血淋巴中的 4 类抗菌肽，它们在抗菌谱上虽彼此重叠，但各自具有特异性

的抗菌谱和抗菌剂量。Cateels 等（1993）应用凝胶抑菌圈法测定了 apidaecin、hymenoptaecin和免疫血淋巴对大约 100 个菌种和菌株的活性。结果表明，大量的人和动物病原菌如克雷白氏杆菌、沙门氏菌和志贺氏杆菌和植物病原菌（如欧文氏菌、*Pseudomonas syringae*、根瘤菌）等均对 apidaecin 非常敏感，hymenoptaecin 可抑制一些对 apidaecin 有抗性的细菌，包括植物病原菌 *Xanthomonas*，其他细菌细球菌、芽孢杆菌、大肠杆菌 K514 被 hymenoptaecin 抑制而不被 apidaecin 所抑制，而大肠杆菌 NCTC9001 则被 apidaecin 抑制而不被 hymenoptaecin 抑制。在液体培养基中测定了 hymenoptaecin 和 apidaecin 的抑菌活性，结果表明，有些菌种，如 *Xanthomonas campestris*，不能被 apidaecin 所抑制，但对 hymenoptaecin 非常敏感。这与抑菌圈法的测定结果完全一致（表 8-2）。可见，这 2 种抗菌肽各有自己特异的抗菌谱，它们相互补充，形成广泛的抗菌能力。

由表 8-2 中还可看到，免疫血淋巴的抗菌谱比单独的 apidaecin 和 hymenoptaecin 的宽，表明血淋巴中的其他抗菌成分如 abaecin 和防卫素也参与了抗菌，从而形成了更为广泛的抗菌谱。

**表 8-2 蜜蜂抗菌肽的生物活性**

| 菌 类 | 抑菌圈直径（mm） | | |
|---|---|---|---|
| | Hymenoptaecin | Apidaecin | 免疫血淋巴 |
| 人和动物致病菌 | | | |
| *Bordetella bronchiseptica* | 6 | — | 7 |
| *Enterobacter cloacae* | — | 6 | 8 |
| *Haemophilus influenzae* | 5 | 5 | 10 |
| *Klebsiella aerogenes* | 5 | 11 | 11 |
| *Salmonella typhimurium* | — | 12 | 13 |
| *Salmonella montevidea* | — | 8 | 10 |
| *Shigella flexneri* | — | 10 | 11 |
| *Yersinia enterocolitica* | 5 | 9 | 10 |
| *Clostridium difficile* | — | — | 10 |
| *Rhodococcus equi* | — | — | 11 |
| *Streptococcus* B | — | — | 13 |
| *Staphylococcus aureus* | — | — | — |
| 植物相关细菌 | | | |
| *Agrobacterium tumefaciens* | — | 16 | 15 |
| *Erwinia salicis* | 5 | 18 | 19 |
| *Pseudomonas syringae* | — | 9 | 10 |
| *Rhizobium meliloti* | 7 | 18 | 15 |
| *Xanthomonas campestris* | 7 | — | 8 |
| 其他细菌 | | | |
| *Escherichia coli* NCTC9001 | — | 13 | 14 |
| *Escherichia coli* K514 | 9 | — | 12 |
| *Escherichia coli* K514（厌氧） | 9 | NT | NT |
| *Micrococcus lysodeikticus* | 10 | — | 19 |
| *Bacillus megaterium* | 10 | — | 12 |

## 2.2 红蝽的抗菌肽

红蝽的抗菌肽有防卫素、红蝽抗菌肽（pyrrhocoricin）和半翅抗菌肽（hemiptericin）3

种。Cociancich 等（1994）测定了防卫素和 pyrrhocoricin 对 9 种革兰氏阳性菌和 9 种 10 菌株革兰氏阴性菌的抑制活性。结果表明，红蝽防卫素是主要抗菌物质，而 pyrrhocoricin 则活性较弱。防卫素对革兰氏阳性菌效果较好，而 pyrrhocoricin 对革兰氏阴性菌更具抑制活性。如对大肠杆菌 D22 抑制活性较防卫素强，表明两者之间有一定的互补作用（表 8-3）。

**表 8-3 红蝽抗菌肽类对微生物的最小抑制浓度**（单位：μmol）

| 肽 类 | 防卫素 | 红蝽抗菌肽 |
|---|---|---|
| 革兰氏阳性菌 | | |
| *Micrococcus luteus* | 0.15～0.3 | 5.0～10.0 |
| *Bacillus megaterium* | 0.15～0.3 | 1.0～2.5 |
| *Aerococcus viridans* | 0.3～0.6 | |
| *Staphylococcus aureus* | 0.62～1.25 | >10 |
| *Staphylococcus saprophyticus* | 1.25～2.5 | |
| *Bacillus subtilis* OB935 | 2.5～5.0 | |
| *Pediococcus acidolactici* | 2.5～5.0 | |
| *Bacillus thuringiensis* | >5 | |
| *Listeria monocytogenes* | >5 | |
| 革兰氏阴性菌 | | |
| *Escherichia coli* D22 | 2.5～5.0 | <1 |
| *Escherichia coli* 1106 | | 5～10 |
| *Enterobacter cloacae* β12 | >5 | 5～10 |
| *Pseudomonas aeruginosa* ATCC82118 | >5 | 5～10 |
| *Salmonella typhimurium* | >5 | >10 |
| *Klebsellia pneumoniae* | >5 | >10 |
| *Serratia marcescans* Db 11 | >5 | >10 |
| *Alcaligenes faecalis* | >5 | >10 |
| *Xanthomonas canpestris* pv *orizae* | | >10 |
| *Erwinia carotovara carotovara* | | >10 |

## 2.3 麻蝇抗菌肽

麻蝇防卫素（sapecin）和麻蝇素（sarcotoxin Ⅰ）的抗菌谱如表 8-4。由表中可知，sapecin 的抗菌谱较广，而 sarcotoxin Ⅰ 对 sapecin 具有显著的互补作用。如 sapecin 对大肠杆菌、宋内氏贺志氏菌和普通变形杆菌效果较差，而 sarcotoxin Ⅰ 对这 3 种菌的活性最强。

**表 8-4 麻蝇抗菌肽类对微生物的最小抑制浓度**（单位：μg/ml）

| 肽 类 | 麻蝇防卫素 (Sapecin) | 麻蝇素 (Sarcotoxin Ⅰ A-GLY) |
|---|---|---|
| *Staphylococcus aureus* FDA209P | 5.0 | >100 |
| *Staphylococcus smith* | 5.0 | >100 |
| *Micrococcus luteus* FDA16 | 1.2 | >100 |
| *Micrococcus luteus* IFO3333 | 1.2 | >100 |
| *Micrococcus luteus* PCI1001 | 10.0 | >100 |
| *Bacillus subtilis* NRRL B-558 | 39.0 | >100 |
| *Bacillus subtilis* PCI219 | 20.0 | >100 |
| *Mycobacterium smegmatis* ATCC607 | 78.0 | >100 |

（续）

| 肽 类 | 麻蝇防卫素 (Sapecin) | 麻 蝇 素 (Sarcotoxin Ⅰ A-GLY) |
|---|---|---|
| *Corynebacterium bovis* 1810 | 2.5 | >100 |
| *Corynebacterium michiganense* | 2.5 | >100 |
| *Xanthomonas orizae* | 20.0 | |
| *Pseudomonas lachrymans* | 78.0 | |
| *Escherichia coli* NIHJ | >78.0 | 6.3 |
| *Shigella sonnei* JS11746 | >78.0 | 12.5 |
| *Proteus vulgaris* OX19 | >78.0 | 6.3 |

## 3 抗菌肽表达水平上的协同

### 3.1 蜜蜂抗菌肽

蜜蜂被大肠杆菌感染后，在不同时间取样，结果表明在感染初期，随着感染时间的延长，蜜蜂的 4 种抗菌肽的 mRNA 均显著增加，增加最快的是 hymenoptaecin 和 abaecin 的 mRNA，在感染后 3～4h mRNA 含量便可见到显著的上升，而防卫素和 apidaecin 的 mRNA则滞后，前者至感染后 12h 才可见到微弱的表达，后者也在感染后 6h 才充分表达。4 种抗菌肽中，以防卫素 mRNA 的表达量最小。这 4 种抗菌肽的基因表达均可持续 36h 以上。

除了表达时间和程度的差异外，这 4 种抗菌肽基因在不同感染程度下的表达也存在差异。蜜蜂 apidaecin 最易表达，即使轻度感染也可诱发。apidaecin 对革兰氏阴性菌的抵抗性强，这是蜜蜂在野外免疫外来细菌的主要抗菌肽。hymenoptaecin 则是 apidaecin 重要的补充肽，一些对 apidaecin 有抗性的细菌，包括植物病原菌 *Xanthomonas* 均可被 hymenoptaecin抑制。abaecin 则作为 apidaecin 的后备肽，很多对 apidaecin 产生抗性的细菌可被 abaecin 抑制，只有当 apidaecin 的杀菌能力丧失后，abaecin 基因才表达。因此，这一基因的表达需要较大的诱导剂量。蜜蜂防卫素基因最后表达，防卫素也是蜜蜂中唯一对革兰氏阳性菌具有活性的抗菌肽，只有那些不能被 apidaecin、hymenoptaecin 和 abaecin 抑制的病原菌，才由防卫素发挥作用。因此，较低浓度的防卫素即可清除残留的革兰氏阳性菌。

### 3.2 果蝇天蚕素基因座的协同调节

Kylston 等（1990）鉴定出了果蝇的天蚕素基因座。该基因座异常紧凑，在不到 4kb 的 DNA 之内有 3 个表达的基因（A1，A2 和 B）及 2 个不表达的假基因，在不到 4kb 距离以外还有另 1 个相似的区。3 个基因的诱导是一致的，但基因 B 表达的水平较低。虽然是协同诱导的，但 3 个基因的侧翼区并不可能作为调节单元的保守序列。因此，这 3 个基因可能各自有独立的调节单元，或者是有 1 个共同的单元统一调节整个基因座。后 1 种调节方式可能对密集的基因更为方便和高效。研究表明，注射细菌后 1h，果蝇体内即有大量 mRNA 积蓄，6h 达到峰值，表明对免疫刺激的反应异常迅速。

### 3.3　惜古比天蚕蛾天蚕素基因的协同调节

Gudmundsson 等（1991）采用 Northern 杂交法研究表明，惜古比天蚕蛾中大蚕素 A 和 B 基因的表达是同步的。A 和 B 基因的转录产物在免疫 2h 后即在血淋巴中出现，48h 后达到高峰。而天蚕素 D 基因转录却比前二者迟，转录产物在 48～96h 才在血淋巴中出现，144h 后才达到高峰。成熟的大蚕素 A 和 B 免疫后 10～24h 在血淋巴中发现，而成熟的大蚕素 D 却迟至 48h 后才能测到。

## 第四节　抗菌肽活性与结构的关系

昆虫是真核生物中最为昌盛的类群。形状差别大，数量最多，生活环境多种多样。这表明昆虫适应环境的本领非常强，对环境中各种病原菌的抵抗十分有效。大量的文献报道了这些抗菌成分的分离和鉴定，绝大部分为抗菌肽或蛋白。这些抗菌肽或蛋白非常简单，它们均是基因的直接产物，没有环状结构，没有不常见的或者 D-型的氨基酸，没有非常复杂的翻译后修饰，因而这些产物可作为医学上的抗生素或作为合理设计合成抗生素的模型。加之病菌对来源于微生物的抗生素产生了越来越高的抗性，因此，寻找其他来源的抗生素对于人类疾病的预防和治疗意义重大。鉴于此，大量学者投身于抗菌肽活性与结构的关系研究，以期获得具有医用价值的活性中心和构型，为进一步开发提供依据。

### 1　抗菌肽的活性中心

### 1.1　麻蝇防卫素

Yamada 等（1994）为了测定麻蝇防卫素（sapecin）B 的结构与活性的关系。参照卡律蝎毒素的空间结构，将 sapecin B 分解为几个部分。由于 7R-17K 在肽链中形成 $\alpha$-螺旋结构，29V～34Q 则形成 $\beta$-折叠结构。故将 sapecin B 分为 4 个短肽，分别命名为 L6D，R11K，G11K 和 V6Q，并将它们的 C-末端分别酰胺化。

| | | | |
|---|---|---|---|
| LTCEID | RSLCLLHCRLK | GYLRAYCSQQK | VCRCVQ |
| ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| LTCEIDa | RSLCLLHCRLKa | GYLRAYCSQQKa | VCRCVQa |
| L6D | R11K | G11K | V6Q |

对这 4 个肽段进行生测，只有 R11K 对金黄色酿脓葡萄球菌有显著的抑制作用，其抑制中量达 0.7～1.5$\mu$ mol，与全肽相当。其他 3 个肽段在浓度达 10$\mu$ mol 时仍无生物活性，这一结果表明 7～17 位的氨基酸对 sapecin B 活性表达非常重要。

测定 R11K 对大肠杆菌的活性发现，R11K 可显著抑制大肠杆菌，抑制中量为 3.0 $\mu$mol。更为惊讶的是，R11K 也能抑制真菌 *Candida albicans*，虽然抑制中量比细菌高一个数量级。进一步的试验表明，R11K 是杀菌剂而不是抑菌剂。它不仅能杀死革兰氏阳性和

阴性菌，也能杀死真菌。

R11K 可与大部分酸性磷酸脂结合，而不像 sapecin B 那样只与心磷脂结合。由于大肠杆菌细胞膜上心磷脂含量比金黄色酿脓葡萄球菌低得多，故 sapecin B 对大肠杆菌的活性较差，而 R11K 可与多种磷酸脂结合，因此对细菌和真菌均具有广泛的杀死作用。

为了验证上述推论，Yamada 等（1994）制备了 2 种包有蔗糖的磷脂小球，其中磷脂的性质分别与金黄色酿脓葡萄球菌和大肠杆菌的细胞膜相似。通过测定外渗的蔗糖量来判断 R11K 和 sapecin B 的活性。当 PtdGly 与心磷脂为 3∶1 时，即与金黄色酿脓葡萄球菌细胞膜类似时，随着 R11K 和 sapecin B 的浓度的增加，外渗的蔗糖量也显著增加。R11K 的使用浓度只有 sapecin B 的 1/10 时便能达到相等的效果。相反，当 ptdEtn∶PtdGly∶CL 为 7∶2∶1 时，即与大肠杆菌细胞膜类似时，R11K 浓度增加时，蔗糖的外渗量增加，但 sapecin B 浓度增加时，外渗量保持不变，甚至达到 100$\mu$ mol 时，仍未引起外渗量的显著变化。这一结果不仅验证了上述推论，也表明 R11K 和 sapecin B 的直接作用靶标是细胞膜。

以上试验说明，R11K 的作用方式是与细菌细胞膜上的酸性磷酸脂相互作用。由于 R11K 一般通过疏水性残基或带正电的残基与磷酸脂相互作用，故改变部分氨基酸应可增加其活性。因此，合成了 4 种 R11K 类似物，测定了它们对金黄色酿脓葡萄球菌和大肠杆菌的活性，结果如表 8-5。

**表 8-5 sapecin B 及其类似物的生物活性**

| 肽 | 氨基酸序列 | *S. aureus* ATCC 6536P ($ID_{50}$, $\mu$ mol) | *E. coli* K-12594 ($ID_{50}$, $\mu$ mol) | 表面张力 ($10^{-5}$N/cm$^2$) |
|---|---|---|---|---|
| R11K | RSLCLLHCRLKa | 1.5 | 3.0 | 65.91 |
| Analogue 1 | RSLCLLHCRLK | 8.6 | 14.0 | 66.88 |
| Analogue 2 | RSLLLLHLRLKa | 0.3 | 1.9 | 61.95 |
| Analogue 3 | RSKCLLLCRLKa | 0.2 | 1.5 | 61.75 |
| Analogue 4 | RSKCLLLCRLK | 0.4 | 2.2 | 62.29 |
| Sapecin B | | 0.7 | >50.0 | |

类似物 1 与 R11K 氨基酸序列完全相同，只是 C-末端没有酰胺化，这导致了抑制中量的大幅上升，可见，酰胺化对活性表达非常重要。类似物 2 将 2 个半胱氨酸换成亮氨酸，以扩大疏水性，使表面张力下降、抑制中量也下降，对阳性菌只有 R11K 的 1/5。类似物 3 将 3 位的亮氨酸换成赖氨酸，以增加 N-端的带电量，使表面张力下降，对阴性和阳性菌的抑制中量也有所下降。类似物 4 与类似物 3 完全一样，只是 C-末端没有酰胺化，结果表面张力略有上升，抑制中量也随之上升。可见，R11K 及其类似物的抑制中量与表面张力的大小相一致。这也表明了亲脂性的加强（表面张力变小）可增强 R11K 的活性。

### 1.2 天蚕素

为了测定天蚕素的活性中心，合成了 1 系列天蚕素类似物，采用 4 种细菌检测活性变化。表 9-18 中 2、4、6 和 8 位的替换一般是用疏水性替换亲水性氨基酸，或者用亲水性

替换疏水性氨基酸。此外，4 和 8 位用脯氨酸替换是为了破坏肽链的 α-螺旋。

2 个截短的类似物，[2-37] 和 [1-33] COOH，对大肠杆菌的活性不变，但只有全序列存在时才对所有测定菌种保持活性。2 位替换类似物 [Phe-2] 对藤黄细球菌的活性只降低了 50%，而 [Glu-2] 对大肠杆菌的活性降低了 90%，对其它 3 种细菌几乎无效，截短类似物 [3-37] 的活性也大幅度下降，表明 Try-2 是必需的残基，2 位在所有天蚕素中均保守，也说明 Try-2 的重要性。替换物 [Pro-4] 和 [Pro-8] 对大肠杆菌的活性与天然肽相当，表明活性表达并不需完整的 α-螺旋。而这 2 个类似物对藤黄细球菌几乎无活性，故当 α-螺旋被破坏后，天蚕素 A 杀菌的广谱性便受影响（表 8-6）。

**表 8-6 天蚕素 A 及合成类似物的致死剂量**

| 天蚕素 A 类似物 | *E. coli* D21 | *P. aeruginos* 0T97 | *B. megaterium* Bm11 | *M. luteus* M11 |
|---|---|---|---|---|
| [1-37] 天然物 | 0.3 | 2.6 | 0.6 | 1.4 |
| [1-37] 合成物 | 0.3 | 1.5 | 0.6 | 1.5 |
| [1-37] COOH | 0.5 | 8.2 | 10.8 | 17.8 |
| [2-37] | 0.4 | 8.6 | 1.5 | 7.3 |
| [3-37] | 2.6 | 90 | 13 | >110 |
| [1-33] COOH | 0.4 | 13 | 24 | 27 |
| [Phe-2] | 0.3 | 3.5 | 0.78 | 7.4 |
| [Glu-2] | 3.2 | 170 | 39 | >170 |
| [Pro-4] | 0.4 | 8.1 | 11 | 87 |
| [Leu-6] | 0.6 | 120 | 0.8 | 7.3 |
| [Glu-6] | 0.6 | 34 | 2.2 | 4.7 |
| [Pro-8] | 0.5 | 15 | 31 | 80 |

综上可知，天蚕素的结构决定着抗菌谱，替换引起抗菌谱的变化，只有完整的天蚕素 A 才能保持其广谱性的特点。此外，酰氨化也是保持广谱性所必需的。

### 1.3 刺蝽抗菌肽

对不同的刺蝽抗菌肽（thanatin）肽段生测结果说明了结构与活性的关系。表 8-7 中数据表明，环的任一端保留 3 个氨基酸残基是对多数革兰氏阳性菌表达活性的最低条件（I11C 和 Y12M）；环的两端同时保留 3 个氨基酸（I14M），对革兰氏阳性、阴性和真菌的活性大为提高。当N-末端再增加 2 个氨基酸（Lys-Pro）时（V16M）活性进一步提高。只有全序列的氨基酸均存在时，对真菌 *N. crassa* 才有 100% 的抑制活性。移去 N-末端的 3 个或 5 个氨基酸，对革兰氏阳性或阴性菌仍分别保持 100% 和 50% 的活性。如果再移去N-末端的 2 个氨基酸（I14M），活性大为降低。C-末端的 3 个氨基酸的移去可保留对革兰氏阳性菌和真菌的部分活力，但对革兰氏阴性菌完全失活。以上分析表明，thanatin 的活性由 4 个部分决定：①由 11 和 18 位的半胱氨酸形成的近 C-端的 6 元环；②C-末端的 3 个延伸的氨基酸残基；③朝 N-端延伸的 7 个氨基酸残基，这 7 个残基大都是疏水性的；④N-末端的另外 3 个氨基酸残基是完全表达抗真菌活性所必需的，但对抗细菌却是不必的。

表 8-7　刺蝽抗菌肽及其类似物的抑菌活性

| 肽 | 氨基酸序列 | 相对活性（%） A. Viridans & M. leteus | E. coli D31 & D22 | N. crassa |
|---|---|---|---|---|
| Thanatin | GSKKPVPIIYCNRRTGKCQRM | 100 | 100 | 100 |
| I11C | IIYCNRRTGKC | 0.5 | 0 | 0 |
| Y12M | YCNRRTGKCQRM | 3 | 0 | 0 |
| G18C | GSKKPVPIIYCNRRTGKC | 25 | 0 | 5 |
| I14M | IIYCNRRTGKCQRM | 50 | 15 | 3 |
| V16M | VPIIYCNRRTGKCQRM | 50 | 50 | 5 |
| K18M | KPVPIIYCNRRTGKCQRM | 100 | 100 | 25 |

### 1.4　蜜蜂抗菌肽

Casteels 等(1994)比较了已发现的 19 种蜜蜂抗菌肽(apidaecins),结果表明,这些肽在几个位置是保守的,最主要的 1 处位于 C-末端,包括 8 个氨基酸的保守序列为PRPPHPRL,另 1 处是位于蜜蜂 apidaecin 第 4 和 5 位的 R/K-P 二肽,第 4 位上除了姬蜂为 K 外,其余均为 R,第 3 处是位于蜜蜂 apidaecin 第 9 位的脯氨酸(除了蜜蜂中的 apidaecinⅢ外)。抗菌活性测定表明,保守序列的取代会导致 apidaecins 的失活。如蜜蜂 apidaecinⅢ(9 位由 Ser 取代 Pro)对所有测定种类的微生物均无效。可见,第 9 位上的保守性氨基酸脯氨酸不能被取代,同样,其他保守序列也不能取代,这些位置都是 apidaecin 的活性中心。

## 2　手性抗菌肽对活性的影响

动物界的很多生物活性肽，如天蚕素（cecropin）、昆虫防卫素（defencin）、刺蝽抗菌肽（thanatin）、蜂针毒素（melittin）和 magainins，均在细胞膜上形成离子孔道而杀死细胞。由于试验用双层膜和生物细胞膜都是手性的，都具有很多不对称中心，因此可能作用于膜上的活性肽也必须具有特定的手性构型才能发挥生物效应。

合成舒缓肽(bradykinin)(Stewart et al,1965 )、催产素(oxytocin)(Flouret et al,1965)和血管紧张肽(angiotensin)(Vogler et al,1965)的 D-型对映体进行研究,结果表明,它们的 D-型对映体均无生物效应。这说明它们的受体是手性的。大多数激素与激素受体之间、底物与酶之间均具有这种手性关系。后者的手性结构要求前者也具有与之相一致的手性构型。

Christensen 等（1988）和 Steiner 等（1988）的研究表明，抗生素类的作用不要求细胞膜上特定的受体。由于生物体内的氨基酸均为 L-型的，通过合成 D-型对映体肽类，则与天然肽类构成镜像异构体。若生物抗生素对膜的作用对手性有要求，则 D-型对映体肽类不能引起生物活性。根据这一原理，研究者合成了几类抗菌肽的 D-型对映体，研究镜像异构体的生物效应，以期进一步明了抗菌肽的作用机制。

### 2.1　几种抗菌肽 D-型对映体的性质

#### 2.1.1　L-和 D-型对映体的物理化学性质比较

为了测定 D-型对映体的生物活性，Wade 等（1990）合成了 3 种天然抗生素和 2 种嵌

合体的 D-型对映体，它们的氨基酸序列如表 8-8。

**表 8-8　合成的天然抗生素 D-型对映体**

（Wade 等，1990）

| 代号 | 肽　类 | 化　学　结　构 |
|---|---|---|
| CA | Cecropin A | KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK amide |
| Me | Melittin | GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ amide |
| Ma | Magainin 2 amide | GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS amide |
| CAM1 | CA (1～13) M (1～13) amide | KWKLFKKIEKVGQGIGAVLKVLTTGL amide |
| CAM2 | CA (1～8) M (1～18) amide | KWKLFKKIGIGAVLKVLTTGLPALIS amide |

用圆二色法测定了天然肽和 D-型对映体的溶液构型。结果表明，无论 L-型还是 D-型抗菌肽，其构型均是六氟-2-丙酮（HFP）溶剂组成〔0%～20%（V/V）〕的函数。在水溶液中，测定肽类均以卷曲和β-结构为主，未发现有α-螺旋，随着 HFP 的扩大，螺旋度增大，天蚕素 A 在 16%的 HFP 溶液中，螺旋度达 75%，蜂针素在 4%～8%时为 60%左右，随着 HFP 浓度的扩大，螺旋度略有提高，Ma 在 20%HFP 中螺旋度仅为 44%，嵌合体 CAM1 的螺旋度较高，在 8%HFP 溶液中接近 90%，CAM2 在 20%HFP 溶液中为 63%。所有 D-型对映体的螺旋度与 L-型天然肽相似，两者在圆二色法测定时反映出精确的镜像异构特性（表 8-9）。

**表 8-9　由圆二色法计算出的肽类构像异构体组成**

| 肽类 | 六氟-2-丙酮（HFP）的含量 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | α-螺旋% | | | | | | β-结构% | | | | | | 卷曲% | | | | | |
| | 0% | 4% | 8% | 12% | 16% | 20% | 0% | 4% | 8% | 12% | 16% | 20% | 0% | 4% | 8% | 12% | 16% | 20% |
| L-CA | 0 | 10 | 59 | 25 | 75 | 75 | 45 | 43 | 29 | 56 | 0 | 0 | 55 | 47 | 12 | 19 | 25 | 25 |
| D-CA | 0 | 0 | 52 | 35 | 72 | 75 | 38 | 53 | 33 | 42 | 0 | 0 | 63 | 47 | 15 | 23 | 28 | 25 |
| L-CAM1 | 0 | 29 | 71 | 50 | 90 | 55 | 47 | 60 | 29 | 32 | 0 | 19 | 54 | 12 | 0 | 18 | 11 | 27 |
| D-CAM1 | 0 | 27 | 59 | 72 | 89 | 71 | 44 | 73 | 37 | 0 | 0 | 0 | 56 | 0 | 4 | 28 | 11 | 29 |
| L-CAM2 | 0 | 40 | 42 | 35 | 56 | 63 | 55 | 52 | 49 | 51 | 14 | 0 | 45 | 8 | 9 | 14 | 30 | 36 |
| D-CAM2 | 0 | – | 46 | 43 | 56 | 63 | 49 | – | 30 | 25 | 5 | 0 | 51 | – | 23 | 32 | 38 | 37 |
| L-Ma | 0 | 0 | 42 | 38 | 38 | 44 | 68 | 68 | 47 | 44 | 41 | 31 | 32 | 32 | 11 | 19 | 21 | 25 |
| D-Ma | 0 | 0 | 42 | 30 | 39 | 43 | 69 | 69 | 40 | 52 | 35 | 31 | 31 | 31 | 19 | 19 | 26 | 26 |
| L-Me | 0 | 74 | 61 | 75 | 75 | 75 | 50 | 13 | 17 | 0 | 0 | 0 | 50 | 13 | 22 | 25 | 25 | 25 |
| D-Me | 0 | 59 | 54 | 69 | 72 | 75 | 48 | 22 | 16 | 0 | 0 | 0 | 52 | 19 | 27 | 31 | 28 | 25 |

天蚕素 A 的 L-型和 D-型异构体被胰蛋白酶和蛋白酶 In A 的分解试验如图 8-1。结果

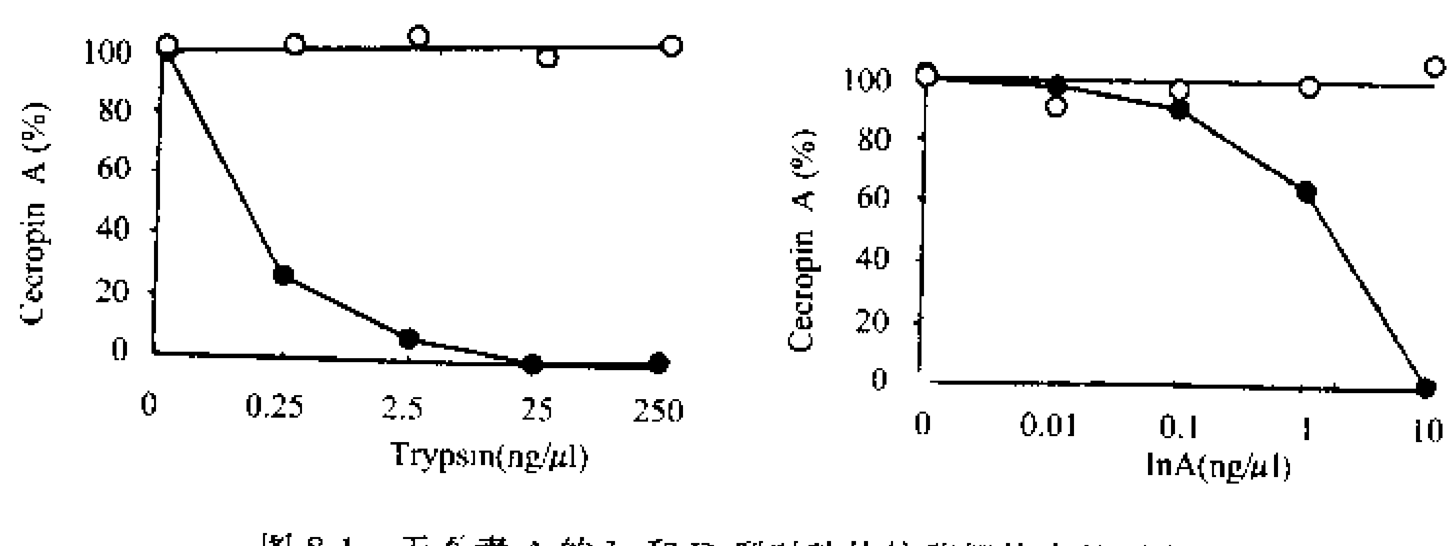



图 8-1　天蚕素 A 的 L-和 D-型对映体抗酶解能力的测定

（Wade 等，1990）

表明，L-型可被胰蛋白酶很快水解失活（在酶:底物为 2 500:1 时 20min 水解 50%），也能被 In A 很快水解（在酶:底物为 200:1 时 20min 水解 50%）。相反，D-型异构体则相当稳定，在胰蛋白酶浓度达到分解 50% L-型的 2 000 倍时，D-型异构体仍不被分解。D-型异构体对 In A 蛋白酶的抵抗性与胰蛋白酶相似。另外，在兔血中，L-型的天蚕素 A 在 2h 之内降解了 50%，但 D-型异构体却稳定得多（半降解时间为 30h），表明 D-型异构体抗酶解能力相当强。

### 2.1.2 L-和 D-型对映体的抗菌能力比较

采用抑制圈生测法测定了以上抗生素 L-型和 D-型对映体的抗菌能力。测定菌种包括 2 种革兰氏阴性菌：大肠杆菌 D21 和绿脓杆菌 OT97；3 种革兰氏阳性菌：枯草杆菌 Bs11、金黄色酿脓葡萄球菌 Cowan1 和酿脓链球菌。虽然这些抗菌肽对上述细菌的抑制作用差异很大，但测定细菌总能被 mmol 级浓度所破坏。对天蚕素 A 最不敏感的细菌为金黄色酿脓葡萄球菌，>300μ mol 的剂量才具有生物效应。嵌合体分子 CM1 对金黄色酿脓葡萄球菌最具活力，其致死浓度比天蚕素 A 低 2 个数量级，嵌合体分子 CM2 活性也很高。此外，蜂针素的抗菌活性也很强，但不能作为抗生素使用。因为蜂针素的选择性很差，对高等动物的毒性也很强，如对羊红细胞的毒性比其他测定的抗生素高 2 个数量级（表 8-10）。

**表 8-10 几种抗生素 L-和 D-型对映体对细菌和羊红细胞的致死剂量**

（单位：μ mol）

| 肽类 | *E.coli* | *P.aeruginosa* | *B.subtilis* | *S.aureus* | *S.pyogenes* | LD 比例 | 红细胞 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L-CA | 0.2 | 1 | 3 | >300 | 5 | 1.3 | >200 |
| D-CA | 0.3 | 0.8 | 3 | >300 | 2 | | >300 |
| L-Ma | 4 | 30 | 3 | 300 | 4 | 2.0 | 300 |
| D-Ma | 1 | 30 | 3 | 100 | 3 | | >400 |
| L-Me | 0.8 | 3 | 0.2 | 0.2 | 0.5 | 1.1 | 4 |
| D-Me | 1 | 2 | 0.4 | 0.1 | 0.9 | | 2 |
| L-CAM1 | 0.5 | 1 | 0.7 | 2 | 1 | 0.7 | >200 |
| D-CAM1 | 0.8 | 2 | 1 | 8 | 0.8 | | 500 |
| L-CAM2 | 0.3 | 0.7 | 0.4 | 1 | 2 | 2.0 | >600 |
| D-CAM2 | 0.3 | 0.6 | 0.2 | 0.3 | 0.8 | | >400 |
| 平均 | | | | | | 1.4 | |

在所有测定的 5 种肽类中，其 L-型与 D-型的生物活性基本相当。如天蚕素 A 的 L-型和 D-型异构体的致死剂量比对大肠杆菌、绿脓杆菌、枯草杆菌、金黄色酿脓葡萄球菌和酿脓链球菌分别为 0.7、1.3、1、1 和 2.5，平均为 1.3；CAM2 的比率为 1、1.2、2、3.3 和 2.5，平均为 2.0；蜂针肽的比率为 0.8、1.5、0.5、2 和 0.6，平均为 1.1。所有 L-型和 D-型抗生素的生物活性比率为 1.4。可见，细胞膜对 L-型和 D-型对映体的生物活性无选择性。

### 2.1.3 L-型和 D-型对映体的抗疟活性

测定了以上抗生素的 L-型和 D-型对映体对疟原虫 *Plasmodium falciparum* 的活性。结果表明，CAM1 和 CAM2 的 D-型异构体的活性是 L-型活性的 5 倍（50% 失活剂量分别为 10μ mol 和 50μ mol），Ma 活性对映体之间差异不大，比嵌合体低 1 个数量级，大蚕素

A 几乎没有生物活性。从这些数据可知，对于原虫细胞膜而言，抗生素的活性存在着手性要求。这表明以上抗生素对细胞膜的作用至少具有两种不同方式：1 种作用靶标不要求手性构型，另 1 种作用靶标则要求手性构型。

### 2.1.4 L-型和 D-型对映体对双层膜电导的影响

测定了以上抗生素对双层膜电导的影响。结果表明，D-型异构体对膜电导的影响与其 L-对映体完全一致。如天蚕素 A 的 L-型和 D-型对映体在 −60mV 电压下，产生 67pS 和 70pS 的单孔道电导，CAM1 在同样的情况下，L-和 D-型对映体均产生 130pS 的单孔道电导。

## 2.2 刺蝽防卫素的手性

刺蝽防卫素（Thanatin）抗菌谱很广，对革兰氏阴性和阳性菌均有很好的杀灭作用，对真菌也非常有效，但 L 型与 D 型有很大差异（表 8-11）。

**表 8-11 Thanatin 及其 D-型对映体对微生物的最小抑制浓度**

（单位：μ mol）

| 肽 类 | L-thanatin | D-thanatin |
|---|---|---|
| 革兰氏阳性菌 | | |
| *Aerococcus viridans* | 0.6～1.2 | 0.6～1.2 |
| *Micrococcus luteus* | 1.2～2.5 | 2.5～5.0 |
| *Bacillus megaterium* | 2.5～5.0 | 0.6～1.2 |
| *Bacillus subtilis* | 2.5～5.0 | 20～40 |
| *Staphylococcus aureus* | — | — |
| *Pediococcus acidolactici* | 20～40 | — |
| 革兰氏阴性菌 | | |
| *Escherichia coli* D22 | 0.3～0.6 | 20～40 |
| *Escherichia coli* D31 | 0.3～0.6 | 20～40 |
| *Escherichia coli* 1106 | 0.6～1.2 | — |
| *Salmonella typhimurium* | 0.6～1.2 | — |
| *Klebsellia pneumoniae* | 0.6～1.2 | — |
| *Enterobacter cloacae* | 1.2～2.5 | — |
| *Enterobacter carotovora* | 10～20 | — |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 20～40 | — |
| 真菌 | | |
| *Neurospora crassa* | 0.6～1.2 | 0.6～1.2 |
| *Botrytis cinerea* | 1.2～2.5 | 2.5～5.0 |
| *Nectria haematococca* | 1.2～2.5 | 1.2～2.5 |
| *Trichoderma viride* | 1.2～2.5 | 1.2～2.5 |
| *Alternaria brassicola* | 2.5～5.0 | 2.5～5.0 |
| *Fusarium culmorum* | 2.5～5.0 | 0.6～1.2 |
| *Ascochyta pisi* | 5～10 | 1.2～2.5 |
| *Fusarium oxyporum* | 10～20 | 5～10 |

Felbaum 等（1996）为了确证 thanatin 是否具有手性细胞靶标的立体专一性识别特性，合成了 D-型对映体，生测结果分为 2 类：①所有革兰氏阴性菌和 3 种革兰氏阳性菌对 D-型对映体不敏感或敏感性降低 2～3 个数量级；②3 种革兰氏阳性菌对 D-型对映体同样敏感，所有测定真菌对 D-和 L-型 thanatin 同样敏感。

不同种类的细菌对 D-型对映体表现出不同的敏感性，这表明 thanatin 具有多种杀菌

机制。

### 2.3　蜜蜂抗菌肽的手性

天然蜜蜂抗菌肽的手性对映体—D-型氨基酸 apidaecin 失去了抗菌活性，细菌对 apidaecin 的颉颃作用也与手性靶标的空间构型的识别有关。

Casteels 等人对 apidaecins 的研究表明，在 19 种 apidaecins 中，有的种类对产生抗性的大肠杆菌有活性，而另一些种类却没有。这些 apidaecins 只有少数的氨基酸存在差异，表明少数氨基酸的改变便能克服细菌对抗生素的抗性。

比较这些 apidaecins 的抗菌活性表明，它们的抗菌谱和对不同菌种的活性度差异很大，由于它们彼此之间差异很小，故通过少数氨基酸的改变便能得到抗菌谱和活性差异很大的一系列产品，这非常有利于 apidaecins 的临床应用。手性抗菌肽的开发可能具有更广阔的前景。

由以上结果可知，D-型异构体抗酶解能力很强，在高等动物肠道和血淋巴中均不易被蛋白酶分解，因而在生物体内具有更长的寿命。D-型异构体对大多数细菌和真菌细胞膜不失活。Wade 等（1996）研究的两个嵌合体进一步改进了常见抗菌肽的杀菌活性，降低了杀菌剂量，扩大了杀菌谱，这些特征甚至可使它们应用于口服，故而具有一定的实际应用价值。

## 第五节　抗菌肽转基因工程

近年来，随着分子技术和生物工程的兴起，抗菌肽的利用普遍受到重视，国内外学者为此都做了不少研究，戴祝英和张双全曾就此进行了综述。

### 1　昆虫抗菌肽的基因克隆与表达

已经构建的昆虫天蚕素（cecropin）及其前体和防卫素（defensin）的 cDNA，它们的典型模式是信号肽、双肽前区、成熟抗菌肽和 α-酰胺前体。多种抗菌肽已在不同体系中得到表达，如天然抗菌肽 cecropinA 和 cecropinB 在昆虫中的表达，柞蚕抗菌肽 D 和绿蝇抗菌肽在酵母中的表达；cecropinA 也在真核系统中得到了表达。Jaynes（1989）将修饰过的 cecropinB 基因以融合蛋白的方式在大肠杆菌中表达。Hellers 等（1991）将编码前 cecropinA 肽原的 cDNA 片断克隆到苜蓿斜纹夜蛾核型多角体病毒（ACNPV）启动子的下游，目的基因成功地出现在重组感染的粉纹夜蛾的末龄幼虫和天蚕蛾滞育蛹中，每 ml 血淋巴中表达量高达 600μg，Reichart（1992）等将绿蝇 defensinA 基因启动子重组构建了载体 PTC3858，并在酵母中得到了表达，每毫升培养基中能分泌 defensin1μg，经过改造加工以后，又提高到了 2～2.5μg。

人工合成昆虫抗菌肽基因的克隆和表达也获得了成功。徐飞等合成了柞蚕抗菌肽 D 基因，将基因克隆于 Bluescript/MB 质粒和过渡质粒 Co24，再转入到根癌脓杆菌 SE，当它感染烟草、番茄叶片时，出现了愈伤组织。谢维等根据已知家蚕 CMIV 的氨基酸序列，选用大肠杆菌编写的密码子，合成了家蚕 CMIV 基因，并将其克隆到金色葡萄球菌 A 蛋白与 IgG 亲和结构域 ZZ 的融合表达载体中，得到 PEZZ318-CM4 质粒，以此质粒转化大

肠杆菌 HB101，得到 ZZ-CM4 融合蛋白的表达，CNBr 切割裂解后，重组 CM4 有较强的抗菌活性，并对肿瘤细胞 U937 和 K562 有抑杀作用。

戴祝英和李秀兰等在家蚕 CMIV 的氨基酸序列的基础上，进行了近 50%的氨基酸置换，设计并合成了新的抗菌肽基因序列。改造过的家蚕抗菌肽类 CMIV 组分全长 37 个氨基酸，其中多属保守性替代，目的是不改变其表达活性，不改变分子的极性以及二亲螺旋的形成和在水溶液中的空间构像。然后在计算机的帮助下，采用大肠杆菌编写的密码子，对 CMIV 组分的 37 个氨基酸进行编码，并在其基因两端设计了限制性核酸内切酶 EcoR Ⅰ，BamH Ⅰ，Nde Ⅰ 和 Asn Ⅰ 的识别位点，在基因序列的中间，又引入了便于对基因进行筛选鉴定的 Bgl Ⅱ 位点，同时设计了起始密码子（ATG）和终止密码子（TAA）。如果抗菌肽基因在细菌中直接表达，其产物势必对寄主菌产生自杀效应。因此采用了 PET28（a）融合表达载体，将化学合成的类 CMIV 基因克隆到 PET28（a）的 Nde Ⅰ 酶切点之后，得到 PET28（a）-类 CMIV 质粒，并以此重组质粒转化大肠杆菌 BL21，得到融合蛋白。该融合前面是一个由 6 个 His 开头的 20 肽，其后是抗菌肽，通过 Ni-金属离子琼脂糖凝胶亲和层析、CNBr 裂解后，获得了同天然抗菌肽一样具有抗菌和抗肿瘤活性的表达产物。

## 2 抗菌肽在动植物转基因工程中的应用

昆虫抗菌肽具有分子量小，抗菌谱广和抗菌能力强等特点。将抗菌肽基因导入植物体内，为获得抗病植株提供了有效途径。抗菌肽基因工程除在模式植物烟草上进行以外，马铃薯也是一个重要的研究对象。Destenfano 等（1991）构建了 Shiva-1 和 SB-37 基因的植物表达载体，已将 Shiva-1 和 SB-37 基因转入烟草和马铃薯中，转 Shiva-1 基因的烟草使青枯病的发病延迟，病情指数和植株死亡率降低。但在 SB-37 转基因烟草中质粒 DC024 重组，通过三亲法导入根癌脓杆菌，以此感染烟草、水稻和桑树叶片取得了进展。此外，国内也有人将抗菌肽基因转入水稻植株，用来抵抗螟虫的为害，初步获得了成功。

抗菌肽转基因动物可明显提高动物的抗病能力，Reed 等将 Shiva1 基因与小鼠 IL-2 基因的 5· 端从-593 到 + 110 区域以及 SV40 的多聚腺苷酸/剪切信号一起感染转入小鼠中，获得的转基因鼠对布鲁氏杆菌病的抵抗力大为增强。Durvasula 等用一个转基因的共生细菌治疗虫媒疾病。当共生菌转入到吸血蝽体内时，由于吸血蝽携带了这种转基因的共生菌，从而使体内的锥虫数量明显减少，达到了阻断锥虫病传播的效果，这种方法可能成为克服人类虫媒疾病的一条新途径。

科学家们现已开始寻找利用抗菌肽基因对癌症作基因治疗的方法，Winder 等将 Cecropin 基因导入人膀胱癌衍生细胞系，然后进行重组细胞对裸鼠致癌效果的观察，发现一些克隆能对小鼠的致癌力丧失或减弱。这种将抗菌肽基因导入肿瘤细胞的方法有可能对癌症的基因治疗提供帮助。

## 3 存在问题和应用前景

### 3.1 存在问题

抗菌肽虽然具有诱人的前景，但天然抗菌肽含量低，提纯成本高，对某些酶极不稳

定。通过基因工程的方法来获得抗菌肽，虽已在原核体系、真核体系获得了成功，但这只是一个起步阶段，离大规模生产还有很大距离，必须要首先解决好下列问题：①表达产量；②产物活性；③产物纯化。这是所有基因工程都面临的一大难题。目前采用的很多方法本身代价不菲，成本太高。因此，无论是天然的或是通过基因表达获得的抗菌肽都存在成本太高的问题，另外，要正式作为药用还必须进行严格的审批，这亦是使研究者望而却步的问题。

### 3.2 应用前景

抗菌肽具分子量小、热稳定、水溶性好和广谱抗菌的能力，它对正常真核细胞几乎无作用，仅作用于原核细胞和发生病变的真核细胞。微量的抗菌肽对耐药细菌、对白血病、宫颈癌、S180、B4 转化细胞及艾氏腹水癌等肿瘤细胞及某些癌实体瘤均具有明显的杀伤作用。尽管在具体环节上还存在很多困难，但抗菌肽仍可望开发成为抗菌、抗病毒和抗肿瘤新药。在农业生产上，因为抗菌肽对动植物病原菌亦有明显抑杀作用，转基因动植物的研究可以对农牧业生产及生物防治和抗病品种的选育起到一定指导作用。

# 第六节 昆虫的肽类毒素

昆虫产生的用以防卫自身、抵御天敌、攻击猎物和实施社会通讯的产物。大多属于肽类毒素。这些肽类的分子量大都小于 $10\times10^3$u。根据其功能将昆虫肽类毒素分为 4 类：

## 1 蜂针肽

蜂针肽（melittin）是最常见的溶血多肽。这些多肽的共同特点是以直接溶解从血清中分离并仔细清洗过的红细胞而得名。昆虫中研究得最为清楚的是蜂针肽，约占蜂毒干重的 50%，就活性而言，它是蜂毒液中的主要毒素。蜂针肽作为两种溶血要素之一，一种是直接溶血素，它本身可以引起红细胞的溶解，Habermann 小组完成了蜂针肽的鉴别、分离和氨基酸序列的测定工作；存在于蜂毒中的磷脂酶 A 是另一种间接的溶血素。

### 1.1 化学结构

已经分离到的 4 种蜜蜂蜂针肽，均由 26 个氨基酸组成，都是以甘氨酸—异亮氨酸—甘氨酸—丙氨酸开始，而且每种蜂针肽的 C-末端均酰胺化。种间的区别仅在第 5，10，15，22，25 和 26 位氨基酸上，而其余的氨基酸均相同（表 8-12）。

**表 8-12 常见蜂针肽的一级结构**

| 昆虫种类 | 蜂针肽一级结构 |
|---|---|
| 意大利蜜蜂（*Apis mellifera*） | GIGAVLKVLTTGLPALISWILRKAQQ-$NH_2$ |
| 东方蜜蜂（*Apis cerana*） | GIGAVLKVLTTGLPALISWILRKAQQ-$NH_2$ |
| 小蜜蜂（*Apis florea*） | GIGAILKVLATGLPTLISWILNKAKQ-$NH_2$ |
| 岩蜂（*Apis dorsata*） | GIGAILKVLSTGLPALISWILRKAQE-$NH_2$ |

Keril（1972，1975）利用蜂针肽序列资料去推测不同种类之间的系统发生关系，经

证明这些关系与形态学、免疫学以及其他生物学的标准是一致的。意大利蜜蜂与东方蜜蜂的蜂针肽的氨基酸序列完全一致。说明这两个种的亲缘关系最近，它们可以异种交叉受精，但是胚胎在发育早期死亡。而岩蜂的蜂针肽有 5 个氨基酸不同于小蜜蜂，同源率达 81%。但只有 3 个氨基酸残基与意大利蜜蜂和东方蜜蜂不同，同源率达 88.5%。根据蜂针肽的结构，Keril（1975）提出蜜蜂属的系统发生树状图。其中小蜜蜂的血统线最早从代表全部蜜蜂共同祖先的树干上分枝出来，而意大利蜜蜂和东方蜜蜂亲缘最近，岩蜂界于小蜜蜂和意大利与东方蜜蜂之间。Engle 等（1973）对不同种类的血蛋白进行电泳和免疫交叉反应，研究结果与上述完全一致。

类似蜂针肽的溶血毒素广泛存在于膜翅目社会性昆虫中，如马蜂激肽（polistin）分子量 $26\times10^3$u，收获蚁溶血肽（barbatolysin）分子量为 350u，由 39 个氨基酸残基组成。

### 1.2 蜂针肽的活性

蜂针肽对高等动物细胞具有很高的生物活性。Wade 等（1990）测定结果表明，蜂针肽对羊红细胞的致死剂量为 2μM，而来源于昆虫的其他一些抗菌肽，如天蚕素 A 对羊红细胞活性很低。

研究表明，蜂针肽不但损害红细胞，而且也损害白细胞及溶酶体（释放溶酶体酶系）、血小板（释放 5-羟色胺）、肥大细胞（释放组胺）和条纹肌系（释放钾离子、有机磷和无机磷化合物）。像其他去污剂一样，蜂针肽破坏束缚酶系统的质膜，减少线粒体中电子的传递，使氧化磷酸化作用解耦联。蜂针引起的刺痛实际上由蜂毒素的数种组分、刺伤组织的神经信号和生化系统被扰乱等多种因子共同作用所引起。

采用抑制圈生测法测定了以上抗生素的抗菌能力。测定菌种包括 2 种革兰氏阴性菌：大肠杆菌 D21 和 *Pseudomonas aeruginosa* OT97；3 种革兰氏阳性菌：*Bacillus subtilis* Bsll、*Staphylococcus aureus* Cowan 1 和 *Streptococcus pyogenes*。蜂针素的抗菌活性很强，对上述 3 种革兰氏阳性菌的致死剂量分别是天蚕素 A 的 15 倍，1 500 倍以上和 10 倍。对革兰氏阴性菌的作用与天蚕素 A 相当或稍低（表 8-13）。

**表 8-13 蜂针肽和天蚕素 A 对细菌和羊红细胞的致死剂量**

（单位：μM）

| 肽类 | 红细胞 | *E. coli* | *P. aeruginosa* | *B. subtilis* | *S. aureus* | *S. pyogenes* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Melittin | 4 | 0.8 | 3 | 0.2 | 0.2 | 0.5 |
| Cecropin A | >200 | 0.2 | 1 | 3 | >300 | 5 |

### 1.3 结构与活性的关系

Habermann 和 Jentsch 鉴定了中欧广泛分布的意大利蜜蜂毒液中蜂针肽的氨基酸序列，他们同时还发现了另一种具有一个 N-末端不同的蜂针肽，后来的鉴定表明 N-末端为甲酰甘氨酸。

蜂针肽初级结构的阐明激发了昆虫学家的兴趣，他们着手研究这种肽的物理化学性质和药理性质。这个蜂针肽是一个含 26 个氨基酸残基的不对称肽，从第 1 到 20 位上主要是疏水性氨基酸残基，而第 21 至 26 位则为亲水性氨基酸，因此这一结构本身具有表面活性

剂的性质。由于亲水残基在蜂针肽中的不均匀分布而本身体积又小，因而不可能成为球状的三维结构。相反，它们在水中时，单体凝聚成四聚体胶束。蜂毒肽具有强烈的表面活性作用，它可以像溶血素溶血卵磷脂或毛地黄皂苷一样，大大降低空气与溶液之间的界面张力。蜂针肽能很快在水溶液中扩散而形成膜，还能够透过卵磷脂和混合脂膜，通透的速度为任何表面活性剂所不及。不论人造脂膜的表面电荷如何，蜂针肽均能渗透和破坏，故蜂针肽的溶血作用可能是破坏了血红细胞膜的三维空间结构。但由于表面活性和溶血能力之间缺少严格的对应关系，故除了表面活性之外，蜂针肽的溶血作用还涉及到其他的分子参数，其中之一可能是它的强碱性。

### 1.4 蜂针肽嵌合体

由于蜂针肽对高等动物细胞和微生物的活性均很强，表明蜂针素的选择性很差，不能作为抗生素使用。Wade 等（1990）合成了两种蜂针肽与天蚕素的嵌合体，其中 CAM1 是以天蚕素 A 的 1-13 位氨基酸与蜂针肽的 1-13 位氨基酸嵌合而成，而 CAM2 是天蚕素 A 的 1-8 位氨基酸与蜂针肽的 1-18 位氨基酸嵌合而成，将 2 个嵌合体酰胺化后，测定了它们对羊红细胞、5 种细菌（包括 2 种革兰氏阴性菌：大肠杆菌 D21 和 *Pseudomonas aeruginosa* OT97；3 种革兰氏阳性菌：*Bacillus subtilis* Bs11、*Staphylococcus aureus* Cowan 1 和 *Streptococcus pyogenes*）的活性（表 8-14）。结果表明嵌合体对高等动物的毒性大为降低，对两种革兰氏阴性菌的活性比蜂针肽稍好，而对 3 种革兰氏阳性菌的活性略差，但比很多抗菌肽要好得多，因此具有良好的实际应用价值。

**表 8-14 蜂针肽和天蚕素 A 对细菌和羊红细胞的致死剂量**

（单位：μmol）

| 肽类 | 红细胞 | *E. coli* | *P. aeruginosa* | *B. subtilis* | *S. aureus* | *S. pyogenes* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Melittin | 4 | 0.8 | 3 | 0.2 | 0.2 | 0.5 |
| CAM1 | >200 | 0.5 | 1 | 0.7 | 2 | 1 |
| CAM2 | >600 | 0.3 | 0.7 | 0.4 | 1 | 2 |

## 2 蜂毒肽

这是一类作用于神经系统的有毒多肽。一些膜翅目、鞘翅目、双翅目和半翅目昆虫的口腔毒素能迅速麻痹攻击的敌人，导致心脏收缩减弱，直至停止跳动。如食虫虻科唾液毒素，甲虫毒素及远东胡蜂（*Vespa mandarina*）毒素、远东胡蜂肽（madaratoxin）等。存在于蜂类中的这类毒素统称为蜂毒肽（apamin）。

### 2.1 化学结构

蜂毒肽的存在最初由 Habermann 小组证实，他们通过凝胶过滤作用筛滤整个胡蜂的肽类时，得到一种活性很强的神经毒肽，在羧甲基纤维素上进一步过滤，并进行氨基酸分析，得到了这种被称为蜂毒肽（apamin）的肽链结构。

蜂毒肽存在于黑胡蜂（*Vespa tropica*）毒液腺中，也存在于意大利蜜蜂中。这是一个由 18 个氨基酸组成的分子量最小的神经毒肽。其中有 4 个半胱氨酸，一个二硫键把第 1

位上的半胱氨酸和第11位上的半胱氨酸连接起来，第二个二硫键把第3位和第15位上的氨基酸连接起来。蜂毒肽是一种包含1个赖氨酸、1个组氨酸和2个精氨酸残基的碱性肽。18肽的蜂毒肽是已知具神经毒性的肽中最短的肽，它的碱性和二硫键交联与蛇毒毒肽相同。蛇毒毒肽一般可分为短链神经毒肽（60～62）残基，4个二硫键和长链神经毒肽（71～74个残基，5个二硫键）两种。蜂毒肽（apamin）的结构式如下：

```
┌──────────────S─S──────────────┐
CysAsnCysLysAlaProGluThrAlaLeuCysAlaArgArgCysGlnGlnHis-amide
      └──────────────S─S──────────────┘
```

## 2.2 结构与活性的关系

通过改变天然蜂毒肽的化学结构，研究结构与毒性的关系。研究表明，第1位上半胱氨酸的α-氨基，第4位赖氨酸上的β-氨基，第17位谷氨酸的羧化物侧链和第18位上组氨酸的咪唑基都不是蜂毒肽的活性所必需的，但这些功能团的同时存在具有一定的增效作用。如第1位半胱氨酸和第4位赖氨酸的α-氨基和β-氨基和第18位上的组氨酸的咪唑基被乙酰化时，蜂毒肽失活。

蜂毒肽序列的最重要部分可能是包括两个精氨酸残基的C-末端区域，第13和第14位上的精氨酸的化学变化，或用胰蛋白酶移除蜂毒肽第14位上的精氨酸均可使蜂毒肽的活性完全消除。

## 2.3 活性与作用部位

给小鼠静脉注射致死剂量的蜂毒肽，15min内引起不协调的运动过度，极度惊厥，接着呼吸困难而死亡。非致死剂量引起小鼠极度兴奋，这种兴奋可以持续60h以上。进一步的研究表明，蜂毒肽的作用部位是神经肌肉突触。它通过降低神经肌肉终板临界电位而使这类突触容易去极化，在低浓度下能专一性地阻止需要$Ca^{2+}$的$K^+$的传导。

远东胡蜂肽是一种分子量为$21\times10^3$u的碱性蛋白，能降低神经轴突上的$Na^+$流量，从而阻碍动作电位的传导。

# 3 激肽

激肽是指一类经内源酶作用后从胞质蛋白质中释放出来的多肽。它们具有血管扩张剂的作用：降低血压，增加血管通透性及产生痛觉。在高等动物中，舒缓激肽（bradykinin）及结构相关的胰激肽（kakkidin），又称赖氨酰舒缓激肽（lysylbradykinin）。甲硫氨酰赖氨酰舒缓激肽（methiohyllysylbradykinin）是内脏肌活动的减压剂，舒缓激肽是其中最有效的疼痛产生剂。社会性膜翅目昆虫中，胡蜂、马蜂和黄蜂毒素中都含有激肽。

昆虫舒缓激肽类似物最早是在欧洲小胡蜂（*Vespa vulgaris*）毒液中发现，通过离子交换层析法，可将欧洲小胡蜂的毒液粗制品分解成3个有激肽活性的峰（1个较大，另2个较小）。小胡蜂激肽的活性在胰蛋白酶中大大降低，而舒缓激肽抗胰蛋白酶的分解，表明这两种激肽存在结构上的差异。大胡蜂的毒液中含有一个抗胰蛋白酶分解的激肽，它与小胡蜂激肽在色谱和酶试验方面有明显的差异（表8-15）。

表 8-15 蜂类中常见的激肽氨基酸序列

| 肽类名称 | 氨基酸序列 |
|---|---|
| 舒缓激肽 | ArgProProGlyPheSerProPheArg |
| 胰激肽 | LysArgProProGlyPheSerProPheArg |
| 甲硫氨酰赖氨酰舒缓激肽 | MetLysArgProProGlyPheSerProPheArg |
| 马蜂激肽 | pGluThrAsnLysLysLysLeuArgGlyArgProProGlyPheSerProPheArg |
| 胡蜂激肽 1 | 糖 糖<br>\| \|<br>ThrAlaThrThrArgArgArgGlyArgProProGlyPheSerProPheArg |
| 胡蜂激肽 2 | 糖 糖<br>\| \|<br>ThrThrArgArgArgGlyArgProProGlyPheSerProPheArg |
| 苏氨酸舒缓激肽 | ArgProProGlyPheThrProPheArg |
| 丙精苏舒缓激肽 | AlaArgArgProProGlyPheThrProPheArg |
| 马蜂激肽 | pGluThrArgLysLysLysLeuArgGlyArgProProGlyPheSerProPheArg |
| 黄翅胡蜂激肽 | AlaArgProProGlyPheSerProPheArgIleVal |
| 金环胡蜂激肽 | GlyArgProHrpGlyPheSerProPheArgIleAsp |

### 3.1 马蜂激肽

马蜂激肽来源于 6 000 头混合种类小胡蜂（*Polistes annularis*、*P. fuscatus* 和 *P. exclamans*）的末端三个腹节，提取物纯化得到 Polistes，被称为马蜂激肽，并鉴定了结构。结果表明，由 18 个氨基酸残基组成，它的 C-末端含有的 9 个氨基酸残基与舒缓激肽的全序列 9 个氨基酸残基完全一致。Polistes 激肽是一种强碱性激肽，它的 18 个氨基酸残基中有 3 个精氨酸和 3 个赖氨酸残基，N-末端由焦性谷氨酸封闭。

Polistes 激肽具有特异的药理学性质，不同于哺乳动物的舒缓激肽、胰激肽和甲硫氨酰基赖氨酰舒缓激肽，它经过鼠肺血管区后不失活，具有持久的低压效应，也是鼠肥大细胞组胺释放的最有效天然刺激剂。

### 3.2 苏氨酸舒缓激肽和丙精苏舒缓激肽

Watanabe 等（1975）从日本小胡蜂（*P. rothneyi iwatai*）毒液中发现两种新的舒缓激肽类似物，即苏氨酸舒缓激肽和丙精苏舒缓激肽。这些舒缓激肽类似物的发现表明小胡蜂毒液中活性肽类存在种间差异。

### 3.3 胡蜂激肽

从中华大胡蜂的毒囊中发现的胡蜂激肽（Vepulakinin）是一种含碳水化合物的舒缓激肽衍生物，它们是最早报道的天然存在的糖肽衍生物和血管活性糖肽。胡蜂激肽与马蜂激肽结构相似，C-末端都具有舒缓激肽。胡蜂激肽 1 含有 17 个氨基酸残基，胡蜂激肽 2 含有 15 个氨基酸残基，它们都是强碱性的肽。在它们的 17 和 15 个氨基酸残基中，各自所含的精氨酸不低于 5 个，具有碳水化合物辅基是这两个肽最显著的特征。

碳水化合物对生物活性的影响目前还不了解。在降低鼠血压方面，胡蜂激肽 1 的效力

以重量计算至少是舒缓激肽的2倍，但反应的持续时间却未显著延长。

此外，胡蜂属中几种社会性昆虫中还存在着激肽的某些衍生物，如金环胡蜂激肽（vespakinin-M）和黄翅胡蜂激肽（vespakinin-X）。这两个肽的结构与前几种昆虫的不同，不是以舒缓激肽或其个别氨基酸的取代物结尾，而是在舒缓激肽的最后一个氨基酸Arg后另加了2个氨基酸。金环胡蜂激肽为异亮氨酸和天冬氨酸，黄翅胡蜂激肽为异亮氨酸和缬氨酸。这些差异表明了胡蜂属激肽的种间差异。

## 4 肥大细胞去颗粒多肽

### 4.1 蜜蜂肥大细胞去颗粒多肽

哺乳动物肥大细胞是碱性白细胞，细胞内具有直径1μm的大型细胞质颗粒，细胞内含有毒素、5-羟色胺和大量组胺。在许多动物中，组织的组胺含量和肥大细胞的数目有良好的线性关系。最早发现注射蜂毒可引起肥大细胞的裂解。蜂针肽和溶血卵磷脂都是溶肥大细胞剂。早期的工作还表明，毒液中蜂针肽和磷脂酶A的量对肥大细胞的作用远大于理论计算值，推测蜂毒液中还有其他因子作用于肥大细胞，进一步的研究表明这是蜜蜂中肥大细胞去颗粒多肽（MCD-肽）的作用，它引起了肥大细胞组胺的释放。氨基酸序列如下：

S—S

IleLysCysAsnCysLysArgHis ValIleLysProHisIleCysArgLysIleCysGlyLysAsn-a

S—S

MCD-肽的结构类似于蜂毒肽，它们都有2个分子内二硫键，都是强碱性肽。在MCD-肽的22个氨基酸残基中，有5个赖氨酸和2个精氨酸，MCD-肽的第3位和第6位，与蜂毒肽的第1位和第4位对应，且它们都具有酰胺化的C-末端。MCD肽的4个半胱氨酸位于第3、5、15和19位，其中第3和第15位的半胱氨酸以二硫键相连，第5和19位的半胱氨酸也以二硫键相连，形成2个分子内二硫键。

MCD-肽是组胺的释放刺激剂，它的特异生物活性不同于蜂针肽，它的活性为蜂针肽的10～100倍。蜂毒中包含50%左右的蜂针肽和1%～2%的MCD-肽。两种因子在蜂毒破坏肥大细胞时均具有非常重要的作用。MCD-肽的药理作用与蜂针肽和蜂毒肽不相同，它没有溶血性，在单独注射后也没有毒性。

MCD-肽在鼠中，引起肥大细胞去颗粒作用的实质是引起5-羟色胺和组胺的释放，因而引起强烈的炎症。与此同时，MCD-肽却能抑制关节炎的发展。这两种明显相反的作用是否均与MCD-肽活性相关，目前还不清楚，但蜂毒对某些风湿性关节炎有益却是众所周知的事实。

### 4.2 胡蜂肥大细胞去颗粒多肽

与蜜蜂相似，社会性胡蜂中也具有肥大细胞去颗粒多肽，称为mastoparans。这些肽存在于胡蜂属（*Vespula*）和小胡蜂属（*Polistes*）昆虫中，mastoparans具有14个氨基酸残基，它们的结构在同属昆虫中较相似，如 *Vespula lewisi* 和 *Vespula xanthoptera* 的mastoparan同源率达64%，*Vespula lewisi* 和 *Vespula mandarinia* 之间同源率达86%。而

不同属之间差异较大。*Vespula lewisi* 和 *Polistes jadwigae* 的 mastoparan 中 14 个氨基酸中有 11 个不同（表 8-16)。Mastoparans 与蜜蜂的肥大细胞去颗粒多肽虽然功能相似，但无任何同源性，它们属于两类完全不同的肽类。

**表 8-16 胡蜂（mastoparans）的氨基酸序列**

| 胡蜂种类 | 氨基酸序列 |
|---|---|
| *Vespula lewisi* | Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu |
| *Vespula xanthoptera* | Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu |
| *Vespula mandarinia* | Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Ile-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu |
| *Polistes jadwigae* | Ile-Asp-Trp-Lys-Lys-Ile-Gly-Gln-His-Ile-Leu-Ser-Val-Leu |

胡蜂 *Vespula mandarinia* 的 mastoparan，在毒液腺中的含量为 20nmol 左右，它在 0.5nmol/ml 时便具有对鼠腹膜肥大细胞的去颗粒活性。mastoparans 均不能引起鼠子宫细胞和 guinea 猪回肠细胞的收缩，也不影响麻醉鼠动脉的血压。Okumura 等（1981）发现 *Vespulalewisi* 的 mastoparan 在 1μg/ml 浓度时使人工膜对离子的通透性增大了 100 倍。据此他们认为在肥大细胞中也发生了类似的离子通透增加作用。

# 第九章 昆虫的抗菌肽

昆虫抗菌肽的产生,是外界因素诱导作用下发生的生物效应。昆虫抗菌肽可被各种各样的刺激所诱导。这些诱导因子既可以是致病性的细菌,也可以是一些不造成感染的物理或化学的因素。例如超声波、射线、生理盐水、聚肌胞核苷(polyI:C)等。屈贤铭等(1984)用超声波处理家蚕、蓖麻蚕或柞蚕,或直接用大肠杆菌注射,均可诱导这些昆虫产生抗菌肽。电泳的结果表明,同1种蚕蛹经不同诱导源处理后形成相同的抗菌肽,而不同种属被诱导产生的抗菌肽则有明显的差异。龚琪等(1993)用$^{60}$Coγ 射线、活的大肠杆菌及热灭活的金黄葡萄球菌、绿脓杆菌和生理盐水作诱导源,诱导美洲大蠊的结果表明,不同诱导源诱导下产生的抗菌物质的活性大小有所不同,达到最大活性的时间亦不同,更重要的是,在抗菌特性上也有一些差异。刘玉滨等(1992)用柞蚕和蓖麻蚕的蛹,棕色鳃角金龟、铜绿金龟和苹毛金龟的幼虫进行试验,经小白鼠肝癌细胞、大肠杆菌或巨大芽孢杆菌分别诱导,均获得成功。除以上种类的昆虫外,在大头金蝇、家蝇、麻蝇、果蝇、蜜蜂、烟草天蛾及粉甲上也都诱导出抗菌物质(表9-1)。由此可见,在外界诱导源的刺激下产生抗菌物质是昆虫的一个共同的特性。

**表 9-1 可诱导昆虫产生抗菌物质的诱导源和所诱导的昆虫**

| 诱导源 | 供试昆虫 |
|---|---|
| 大肠杆菌 | 家蚕、美洲大蠊、蓖麻蚕、柞蚕 |
| 绿脓杆菌 | 蓖麻蚕、美洲大蠊 |
| 金黄葡萄球菌 | 柞蚕、美洲大蠊 |
| 巨大芽孢杆菌 | 果蝇、柞蚕、蓖麻蚕、棕色鳃角金龟 |
| poly I:C | 家蝇 |
| 2', 5' -寡腺苷酸 | 绿蝇 |
| 小鼠肝癌细胞 | 蜜蜂、柞蚕、蓖麻蚕 |
| 超声波 | 粉甲、家蚕、蓖麻蚕、柞蚕 |
| $^{60}$Coγ 射线 | 棕色鳃角金龟、美洲大蠊 |
| 生理盐水 | 铜绿丽金龟、苹毛丽金龟、美洲大蠊 |

根据分子结构特点，昆虫的抗菌肽可分为4个肽族。

第一族为天蚕素（cecropins）。分子量为$4\times10^3$u，分子两端为两亲性的α-螺旋，两个α-螺旋由一小段直链肽连接。对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有显著的抑制活性。

第二族为环状的抗菌肽。所有种类均含有分子内双硫键。二硫键数目可以是1个，如刺蝽防卫素（thanatin）；3个，如防卫素（defensins）、麻蝇防卫素（sapecins）；或4个，如果蝇防卫素（drosomycin）。

第三族为富脯氨酸抗菌肽类。此族肽分子量范围从$2\sim4\times10^3$u，肽链结构存在相似之处，不含半胱氨酸残基。此肽族主要成员有蜜蜂抗菌肽（apidaecin）、蜂蛾抗菌肽（adaecin）、果蝇抗菌肽（drosocin）、红蝽抗菌肽（pyrrhocoricin）和梅氏抗菌肽（metchnikowin）等。此族肽类主要抑制革兰氏阴性菌，但metchnikowin可抑制革兰氏阳性菌和真菌。

第四族为富甘氨酸抗菌肽类。此族肽的变异性更大，分子量从（10～30）$\times10^3$u，多数种类抑制革兰氏阴性细菌，如天蚕抗菌肽（attatin）。

# 第一节 天蚕素族

20世纪70年代中期，瑞典斯德哥尔摩大学Boman等从美国天蚕蛾中首先获得抗菌肽，后由Steiner及其同事（1981）确定了天蚕素（cecropins）A和B的一级结构顺序。此后，从大量鳞翅目昆虫中发现了天蚕素的存在。天蚕素分子量大小为$4\times10^3$u，是一族碱性多肽，对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有显著的抑制活性。

这些特性使天蚕素容易分离和鉴定。Hultmark等（1980）在pH4.0的条件下，利用聚丙烯酰胺凝胶电泳将受过免疫攻击的昆虫血淋巴蛋白质分离，接着在凝胶上加上包裹着适当细菌的软胶，过夜后检查凝胶上抑菌斑即可确定天蚕素的位置。用此法分离出了多种天蚕素。

## 1 天蚕素

### 1.1 一级结构

在惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）的蛹内，已经鉴定出的天蚕素包括天蚕素A、B和D3种。天蚕蛾蛹内还具有4种浓度较低的抗菌成分，其中2种就是天蚕素的前体，在C-末端多1个甘氨酸残基。其中未酰胺化的天蚕素A后有1个甘氨酸的序列由Hultmark等（1982）发现，被称为天蚕素C。C-末端的甘氨酸在随后的加工中提供氨基将赖氨酸酰胺化，而形成天蚕素A。柞蚕的天蚕素由Qu，X.M.等（1982）分离，与惜古比天蚕蛾相似。在柞蚕中，也存在天蚕素A、B和D。其中天蚕素D活性最高，天蚕素A和B活性较低。家蚕中的天蚕素不久之后也分离出，与上述2种蚕蛾相似。家蚕血淋巴中也存在3种天蚕素，分别称为天蚕素A、CM4和CM4ph。由Hoffmann等（1981）在大蜡螟和其他7种鳞翅目昆虫中也发现了天蚕素类似物的存在。表明这类抗菌素广泛存在于鳞翅目昆虫中。

表9-2中列出了从惜古比天蚕蛾、柞蚕和家蚕中鉴定出的9种天蚕素，除了柞蚕中的

大蚕素 A 未能鉴定到 C-末端外，其余 8 种天蚕素的 C-末端均酰胺化。这 9 种天蚕素都包含着 9 个连续的碱性氨基酸（22～30 位）。对天蚕素 A 和 B 而言，其 N-端强碱性，而天蚕素 D 的 N-端碱性中等。在天蚕素 A 和 B 中，具有 5 处影响分子性质的氨基酸替代，这些替代都位于中部或 C-末端部分（13，17，31，33 和 37）。天蚕素 A 和 D 则具有 6 处相异之处。它们均处于中部或 N-端，其中 5 处（1，3，7，14 和 21）代换影响电荷的分布，而位 4 的代换则影响 α-螺旋的形成。这些天蚕素结构非常相似，惜古比天蚕蛾的天蚕素 B 和 D 同源率达 65%，柞蚕的天蚕素 B 和 D 同源率达 62%。

**表 9-2 鳞翅目昆虫主要抗菌肽——天蚕素结构**

| 昆虫种类 | 肽类名称 | 氨基酸序列 |
|---|---|---|
| *Hyalophora cecropia* | cecropin A | KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-$NH_2$ |
| | cecropin B | KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL-$NH_2$ |
| | cecropin D | WNPFKELEKVGQRVRDAVISAGPAVATVAQATALAK-$NH_2$ |
| *Antheraea pernyi* | cecropin A | KWKIFKKIEKMGQNIRNGIIKAGPAVAVLGEVLGEA-$NH_2$ |
| | cecropin B | KWKIFKKIEKVGRNIRNGIIKAGPAVAVLGEAKAL-$NH_2$ |
| | cecropin D | WNPFKELERAGQRVRDAIISAGPAVATVAQATALAK-$NH_2$ |
| *Bombyx mori* | cecropin A | RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVLGSAKAI-$NH_2$ |
| | CM4 | RWKIFKKIEKVGQNIRDGIVKAGPAVAVVGQAATI-$NH_2$ |
| | CM4ph | GNFFKDLEKAGQRVRDAVISAAPAVDTLAKAKALGQ-$NH_2$ |

## 1.2 二级结构

在亲脂性的溶液中，天蚕素的分子两端形成两亲性的 α-螺旋。其中 N-端从位 1 到位 11，带有大量正电荷，强碱性，具有亲水性质。中段从 12 位到 24 位，其中 14 到 17 位的氨基酸具有形成 β-结构的倾向，23 和 24 位上的甘氨酸和脯氨酸是 α－螺旋结构的终止氨基酸，故中段是具有一定弹性的链状结构。C-末端氨基酸中性，大都为疏水性氨基酸，其中少数氨基酸也具有亲水性质。这决定了天蚕素与细胞膜的亲和力非常强。故天蚕素的二级结构为：相对的两亲性 α-螺旋处于两端，两个 α-螺旋由一小段柔性的直链肽连接，形成圆筒形结构。由于细胞膜为亲脂性结构，故天蚕素的这种二级结构对破坏细胞膜结构具有重要的生理学意义。

Hara 等（1994）和 Shai 等（1995）对天蚕素的研究表明，天蚕素具有酰胺化的 C-末端，酰胺化可维持天蚕素 α-螺旋的稳定，而这一稳定的空间结构是天蚕素破坏生物膜所必需的。此外，天蚕素酰胺化的 C-末端可抵御菌类蛋白酶的分解（Yamata et al，1994）。

虽然至今未曾发现，但天蚕素中一定存在着自身识别结构以避免对自身细胞的伤害。对蜂针肽的研究发现，蜜蜂通过合成无活性的前蜂针肽避免自身毒性，后者通过逐步剪去双肽而激活。

## 1.3 抗菌谱

Steiner 等（1981）采用抑菌圈法测定了天蚕素 A 和 B 的抗菌谱，测定物种包括大肠杆菌 K12、D31、粘质沙雷氏菌（*S. marcescens*）、绿脓杆菌（*P. aeruginosa*）、*X. nematophilus*、巨大芽孢杆菌（*B. megaterium*）和枯草杆菌（*B. subtilis*），除

*X. nematophilus* 为天蚕的寄生性线虫外，其他均为细菌。测定结果表明，被免疫攻击了的昆虫，其血淋巴对测定物种均具有明显的抑制活性。天蚕素A和B具有相似的抗菌谱，它们都对大肠杆菌、*X. nematophilus*、巨大芽孢杆菌具有显著的抑制作用；对粘质沙雷氏菌、绿脓杆菌有一定的活性；对枯草杆菌天蚕素A无活性，而B有一定的活性。

致死剂量法测定结果如抑菌圈法相似。天蚕素A与B抗菌谱相似，而天蚕素D差异较大。天蚕素D对大肠杆菌和 *Aconetpbacter calcoaceticus* 活性较高，与A和B相似，致死剂量分别为0.4μM和1.4μM，而对其他菌种活性均较低，致死剂量高达14~100μM。此外，3种天蚕素对苏云金杆菌均无效。进一步研究表明，苏云金杆菌的细胞质对天蚕素敏感，表明苏云金杆菌细胞壁具有阻止天蚕素进入细胞的作用。

**表9-3 惜古比天蚕蛾天蚕素的抑菌活性**

| 菌 种 | 菌 株 | 致死剂量（μmol） | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 天蚕素A | 天蚕素B | 天蚕素D |
| *Escherichia coli* | D21 | 0.3 | 0.3 | 0.4 |
| | D31 | 0.2 | 0.3 | 0.4 |
| *Acinetobacter calcoaceticus* | Ac11 | 0.3 | 0.7 | 1.4 |
| *Xenorhabdus nemotophilus* | Xn21 | 1.4 | 1.6 | 19 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | O197 | 2.6 | 1.9 | 100 |
| *Serratia marcescens* | Db11 | 4.2 | 4.5 | 14 |
| *Micrococcus luteus* | Ml11 | 1.4 | 1.3 | 21 |
| *Bacillus megaterium* | Bm11 | 0.6 | 0.4 | 41 |
| *Bacillus subtilis* | Bs11 | 61 | 18 | >95 |
| *Bacillus thuringiensis* | Bt11 | >80 | >133 | >95 |
| *Enterococcus faecalis* | AD-4 | 15 | 7.3 | >95 |

我国学者李文楚等（1991）测定了柞蚕的天蚕素D对水稻白叶枯病细菌和青枯病细菌的抑制作用。结果表明，天蚕素D对这2种细菌均有明显的杀菌作用，杀菌剂量在各菌株之间存在着一定差异，对敏感株的有效剂量为2.0ng/穴。测定了天蚕素A和蜂针肽对大肠杆菌D31和Chang肺细胞的裂解作用。结果表明，两者对大肠杆菌细胞均有显著的裂解作用，但对Chang肺细胞只有后者表现出明显的裂解活性。此外，天蚕素对羊红细胞也无溶血活性，表明天蚕素A对不同类型细胞具有选择性。

### 1.4 作用方式

Christensen等（1988）合成了几种天蚕素及其类似物，以研究天蚕素对双层脂结构（图9 1）的细胞膜的作用方式。

选择的肽共9种，其中天然肽包括惜古比天蚕蛾的天蚕素A、B和D。MP系列是合成的天蚕素类似物。其中MP1保留了天蚕素A的N-端，其他两段改变了部分氨基酸，使之均具有两亲性质；MP2保留MP1的N-端和中段，而将C-末端换成疏水性的；MP3保留了MP2的N-端和C-端，而换成了柔性的中段；MP4则只保留了天蚕素A的N-端；A（1~11）D（12~37）则将天蚕素A的N-端和D的其余两段拼接；D（8~37）保留了天蚕素D的后端部分。

用电物理学方法研究了这些肽在加压条件下对人工合成的双层膜的影响。天蚕素及大部分人工合成类似物在生理浓度下都能诱导双层膜形成大孔洞。在0.1mol氯化钠溶液中

| | | | |
|---|---|---|---|
| cecropin A | KWKLFKKIEKV | GQNIRDGIIKAGP | AVAVVGQATQIAKa |
| | 两亲性 N-端 | 柔性中段 | 疏水性 C-端 |
| MP1 | KWKLFKKIEKV | AKKIKEAIEKALE | AVAKLLKEAKEIAKa |
| | 两亲性 N-端 | 两亲性中段 | 两亲性 C-端 |
| MP2 | KWKLFKKIEKV | AKKIKEAIEKALE | AIAVLALALALa |
| | 两亲性 N-端 | 两亲性中段 | 疏水性 C-端 |
| MP3 | KWKLFKKIEKV | GRNGRNGIVKAGP | AIAVLALALALa |
| | 两亲性 N-端 | 柔性中段 | 疏水性 C-端 |
| MP4 | KWKLFKKIEKVa | | |
| | 两亲性 N-端 | | |
| A(1~11)D(12~37) | KWKLFKKIEKV | GQRVRDAVISAGP | AVATVAQATALAKa |
| | 两亲性 N-端 | 柔性中段 | 疏水性 C-端 |
| cecropin D | WNPFKELEKV | GQRVRDAVISAGP | AVATVAQATALAKa |
| | 两亲性 N-端 | 柔性中段 | 疏水性 C-端 |
| D(8~37) | EKV | GQRVRDAVISAGP | AVATVAQATALAK |
| | | 柔性中段 | 疏水性 C-端 |
| cecropin B | KWKVFKKIEKM | GRNIRNGIVKAGP | AIAVLGEAKAILSa |
| | 两亲性 N-端 | 柔性中段 | 疏水性 C-端 |

图 9-1 天蚕素及其类似物的双层脂结构

单孔道电导可达 2.5ns，这表明膜上至少形成了直径达 4nm 的孔道。由天蚕素 AD 和 MP3 形成的孔道对离子通透具有选择作用。在 0.1mol 的氯化钠溶液中，氯离子和钠离子的选择比为 2:1，表明这些孔道更易使阴离子透过。短肽 MP4 和 D（8～37）虽可被双层膜吸附，但不能形成孔道。结果比较表明，在两亲性的 N-端和疏水性的 C-端之间，柔性的中段是形成离子孔道必不可少的条件。天蚕素 AD 不仅是测定肽类中最有效的杀菌剂，也是最有效的离子孔道形成剂。带正电荷或含有胆甾醇的双层膜使天蚕素 AD 和 MP3 诱导孔道的形成能力至少降低了 80%，这正是天蚕素对真核细胞无效的主要原因。以上结果表明，天蚕素对细菌的杀灭是由于在细胞膜上形成了大的离子孔道，使细胞外离子和水内渗，引起细胞裂解所致。这是很普遍的 1 种引起侵入者细胞死亡的方法。如 T 细胞中的穿孔素（perforins）、大肠杆菌中的溶血素（hemolysin）和 *Entamoeba histolytica* 中的阿米巴穿孔素（amoebapore）均引起外来生物细胞膜的穿孔。

根据以上研究结果，结合在其他小分子孔道诱导肽类如 alamethicin 和蜂针素（metillin）上的结果，膜上孔道的形成包括以下步骤。

（1）Christensen 等（1988）的研究结果表明，天蚕素对双层膜孔道的诱导作用与浓度无关。这表明当浓度升高时，天蚕素分子大量聚集在一起，将两亲性的 N-端外露，疏水性的 C-端内包。这种聚集现象在其他肽中也广泛存在（Tayler 等，1986）。天蚕素的寡聚体带有大量正电荷，能够被双层膜的静电引力所吸引，即使是本文研究的短肽 MP4 和 D（8～37）也不例外。带正电的膜对天蚕素的寡聚体有排斥作用，这就是正电荷双层膜降低天蚕素 AD 和 MP3 诱导孔道形成的原因。

（2）孔道形成的第二步即吸引至膜上的天蚕素分子将其疏水性的 C-末端插入膜内疏水性部分，将两亲性的 N-端放置在水膜界面的过程。这一过程只有那些在 N-端和 C-端之间具有柔性中段的肽类能完成，如本文的天蚕素 AD、B、A 和 MP3，而对于肽链刚性较强的种类，如 MP1 和 MP2，这一过程便不能进行。这一过程与膜的电荷性质、流动性和

偶极化能力密切相关。

(3) 孔道形成的第三步必需有正电压的存在。这一步是带有正电荷的两亲性 N-端插入膜内，形成跨膜构型的过程。跨膜构型使天蚕素寡聚体的正电荷面均朝内，围成1个带正电充满水的孔道。这类孔道显然对负离子的选择通透性较强。胆甾醇的存在，可以影响两亲性 N-端的插入深度和膜的流动性，从而阻止天蚕素的跨膜，由于真核细胞膜上具有胆甾醇，故能抵抗天蚕素的穿孔。

我国学者测定了柞蚕天蚕素 D 对活体大肠杆菌的影响。在适宜条件下，柞蚕天蚕素 D 作用于水稻白叶枯病细菌后，5min 即能使细菌外壁层受到损伤。扫描电镜观察到细菌端部形成喇叭状的缺口，15min 后可见包囊状泄出物，透视电镜观察到严重损坏的剖面，被天蚕素 D 作用的区域形成微管通道。随着时间的延长，细菌细胞膜严重损伤，致使其内容物泄出胞外，形成囊状物。大肠杆菌菌体死亡后仍保持外形而不致立即崩溃，有时观察到泄出内容物将菌体包被的现象。

在大肠杆菌 K12、D31 的培养液中加入天蚕素 D，经 5～10min，测知溶液中钾离子浓度急剧增加，20min 后则趋于停顿。表明细菌细胞膜被破坏后，钾离子大量逸出，直至菌体死亡而停止。

在大肠杆菌 K12、D31 的培养液中加入天蚕素 D，但培养物中耗氧量无大变化。表明天蚕素 D 导致细菌死亡与耗氧量无直接关系。

### 1.5 天蚕素的前体物

von Hofsten（1985）克隆出惜古比天蚕蛾天蚕素 B 的 cDNA，分析 cDNA 的结构表明，在天蚕素 B 的 N-端还有 26 氨基酸残基，由于 23 和 24 位上的 Ala-Ala 可能是信号肽的剪切位点，信号肽可能由 N-端的 22 个氨基酸组成，剪切后遗留在天蚕素 B 的 N-端的 4 个氨基酸 Ala-Pro-Glu-Pro，与原蜂针肽前的 4 个氨基酸相同。由于血淋巴中存在 Ala-Pro-R-识别性蛋白酶，也许原天蚕素是经血淋巴中这种酶每次移除 2 个氨基酸逐步加工而成。比较这一 cDNA 产物与 Matsumoto 等（1986）克隆出的麻蝇素（sarcotoxin）Ⅱ的 cDNA 产物可知，其信号肽同源率极高（15 个残基中有 11 个相同），同时这一区域与前原天蚕素 A 的相同区域同源率也极高。由于信号肽是进化最快的区域，这种保守性显然具有重要的生物学意义。

cDNA 编码的肽段表明，天蚕素完整分子之后总有 1 个多余的甘氨酸，表明酰胺化过程中由甘氨酸贡献氨基，这一酰胺化原理在蜂针肽和几种脑激素中均已发现。可见，从前原天蚕素加工成成熟的天蚕素必需经过二到三步的两端加工。

## 2 麻蝇素

### 2.1 麻蝇素Ⅰ

#### 2.1.1 化学结构

Okada 等（1985）从经过免疫攻击的棕尾别麻蝇（*Sarcophaga peregrina*）3 龄幼虫

的血清中分离出3种麻蝇肽Ⅰ，分别称为sarcotixinⅠA、ⅠB和ⅠC。它们都具有39个氨基酸残基，结构相似，仅有少数氨基酸不同。ⅠA与ⅠB在24位（甘氨酸和缬氨酸）、25位（亮氨酸和异亮氨酸）和27位（异亮氨酸和缬氨酸）不同，ⅠA与ⅠC在4位（赖氨酸和精氨酸）和24位（甘氨酸和缬氨酸）不同。研究表明，sarcotixinⅠ的氨基酸序列与天蚕素相似，两者同源率很高。

SarcotixinⅠA、ⅠB和ⅠC均包含两个部分：N-端部分从1～19位，含有9个带正电荷的氨基酸，其中7个是碱性氨基酸，N-端部分亲水性很强；C-端部分从20～39位，除了最末端的精氨酸带正电荷外，其他氨基酸均是非极性的，C-端部分是疏水性区域。N-端带正电荷的氨基酸有规律的分布在肽链上，相互之间隔开2～3个中性氨基酸，若此段的二级结构为α-螺旋，则所有带正电荷的氨基酸均处于同一方向。此外，C-端部分的整体结构无论从长度和疏水程度均与高等动物的跨膜信号肽相似（表9-4）。

**表9-4　棕尾别麻蝇素的氨基酸序列**

| 肽类名称 | 氨基酸序列 |
|---|---|
| sarcotixinⅠA | GWLKKIGKKIERVGQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATAR-$NH_2$ |
| sarcotixinⅠB | GWLKKIGKKIERVGQHTRDATIQVIGVAQQAANVAATAR-$NH_2$ |
| sarcotixinⅠC | GWLRKIGKKIERVGQHTRDATIQGLGVAQQAANVAATAR-$NH_2$ |
| sarcotixinⅠD | GWIRDFGKRIERVGQHTRDATIQTIAVAQQAANVAATLKG |

sarcotixinⅠD由Matsuyama等（1988）从棕尾别麻蝇胚胎细胞系NIH-Sape-4中分离，这个抗菌肽含有40个氨基酸残基，C-末端为甘氨酸，与此同时，在胚胎细胞系中也分离到称为CM-Ⅱ的抗菌肽，此肽除C-末端多了1个甘氨酸外，与sarcotixinⅠA完全相同。这表明在胚胎细胞系中，缺少将40位甘氨酸切除同时将39位精氨酸氧化的酶。由此推论，若在虫体内，sarcotixinⅠD的成熟形式也该具有39个氨基酸，且第39位的精氨酸被酰胺化。

分析麻蝇素的4个成员可知，麻蝇素包含4个保守区段，第1和2位的甘氨酸和色氨酸；第7和8位的甘氨酸和赖氨酸；第11到24位的异亮氨酸、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、苏氨酸、精氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、苏氨酸、异亮氨酸和谷氨酰胺区段；第29～38位的丙氨酸、谷氨酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、缬氨酸、丙氨酸、丙氨酸、苏氨酸区段。这些保守区段显然是麻蝇素抗菌所必需的。

### 2.1.2　cDNA克隆

Matsumoto等（1986）以sarcotixinⅠ第8～12位上的共有序列KKIER为依据，合成了寡核苷酸探针，从5 000个来源于脂肪体poly（A）RNA的cDNA文库中筛选出了20个阳性克隆，从中选择了与探针反应最为强烈的pTO19，测定了插入片段的序列（图9-2）。

pTO19含有一个长度为428个碱基的插入片段，此片段在3'-端具有长度为101个碱基的poly（A）尾段，可读框编码63个氨基酸残基，包含sarcotixinⅠA全序列，此序列上游还具有一个23个氨基酸的信号肽。可见，pTO19是sarcotixinⅠA的cDNA克隆。

pTO19的核苷酸序列表明，sarcotixinⅠA的最后1个氨基酸精氨酸与终止密码子之间，还有1个甘氨酸，故前原sarcotixinⅠA应以甘氨酸结尾，在poly（A）上游9个碱基

```
AACAGTTGTCATTTAACTGAAGAGCCACTAGTTGGAAAAAATTAATTTCTTTGATTACGCAAAAGAAAGC 70
AAATAAAATTCAAC ATG AAT TTC CAG AAC ATT TTC ATT TTC GTT GCC TTA ATA TTG 126
               Met Asn Phe Gln Asn Ile Phe Ile Phe Val Ala Leu Ile Leu 14

GCT GTC TTT GCC GGA CAA AGT CAG GCT GGT TGG TTG AAA AAG ATT GGC AAA AAA 180
Ala Val Phe Ala Gly Gln Ser Gln Ala Gly Try Leu Lys Lys Ile Gly Lys Lys 32

ATT GAA CGC GTT GGA CAA CAT ACT CGT GAT GCC ACC ATA CAA GGT TTG GGT ATA 234
Ile Glu Arg Val Gly Gln His Thr Arg Asp Ala Thr Ile Gln Gly Leu Gly Ile 50

GCT CAG CAG GCA GCA AAT GTT GCT GCT ACA GCC AGA GGT TAA TTGAAAAATCAATTG 291
Ala Gln Gln Ala Ala Asn Val Ala Ala Thr Ala Arg Gly ***                 63

TTATGCTTAAGTTCGAATTGTAATAAAAATTTTAAG(A)n                                428
```

图 9-2 sarcotoxin Ⅰ A 的 cDNA 序列及导出的原 sarcotoxin Ⅰ A 序列

(Matsumoto, 1986)

处，具有附加信号 AATAA 共有序列。

sarcotixin Ⅰ A 测序结果为 39 个氨基酸，而根据 pTO19 核苷酸序列推导结果为 40 个氨基酸，可能是前原 sarcotixin Ⅰ A 在翻译后加工中以 40 位甘氨酸的氨基将 39 位的精氨酸酰胺化，形成酰胺化末端。为了证实以上推论，Matsumoto 等（1986）人工合成了 sarcotixin Ⅰ A的 3 种分子，即 39 个氨基酸的 sarcotixin Ⅰ A，39 个氨基酸并酰胺化的 sarcotixin Ⅰ A和 40 个氨基酸的 sarcotixin Ⅰ A，与天然 sarcotixin Ⅰ A 经液相色谱分析表明，只有酰胺化 sarcotixin Ⅰ A 可与天然 sarcotixin Ⅰ A 形成单峰，其他与天然 sarcotixin Ⅰ A 混合后经高效液相色谱均出现了分离，证明天然 sarcotixin Ⅰ A 的 C-末端酰胺化。

### 2.1.3 生物活性

Okada 等（1985）测定了 sarcotixin Ⅰ A、Ⅰ B 和 Ⅰ C 对大肠杆菌 K12 的抗菌活性，结果表明，Ⅰ A 和 Ⅰ B 对大肠杆菌的活性相似，而 Ⅰ C 低 1 半左右。

研究表明，聚赖氨酸具有与 Sarcotixin Ⅰ A、Ⅰ B 和 Ⅰ C 相似的活性，在 Sarcotixin Ⅰ A 和 Ⅰ B中存在 Lys-Lys-Ile 结构，可能这一结构的存在对活性表达相当重要。由于 Ⅰ A 和 Ⅰ C的不同之处仅在 4 位和 24 位，Ⅰ A 和 Ⅰ B 的 24 位也不同，但抗菌活性相似，故可能 Ⅰ C第 4 位的精氨酸取代 Ⅰ A 的赖氨酸，影响了活性的发挥，从而使 Ⅰ C 成为 sarcotixin Ⅰ 中活性最低的。

Matsumoto 等（1988）测定了 sarcotixin Ⅰ A-Gly 的抗菌活性，结果表明，这一抗菌肽除对大肠杆菌 NIHJ（最小抑制浓度为 6.3μg/ml）效果较好外，对普通变形杆菌（*P. vulgaris*）OX19（最小抑制浓度为 6.3μg/ml）和宋内氏志贺氏菌（*S. sonnei*）JS11746（最小抑制浓度为 12.5μg/ml）也有较好的效果。而对测定的大多数革兰氏阳性菌几乎无效。

Matsumoto 等（1986）以 pTO19 为探针，采用 Northern 杂交手段检查经过免疫攻击的麻蝇 3 龄幼虫不同时间脂肪体内的 mRNA 数量，结果表明，正常的 3 龄幼虫未发现 sarcotixin Ⅰ A 的 mRNA，表明基因转录在此时关闭。免疫攻击后 1.5h，便可测出已转录出的

mRNA，6h后达到高峰，随后逐步下降。这表明遭受免疫攻击的3龄幼虫通过激活sarcotixin Ⅰ A基因的转录，而不是通过对前原sarcotixin Ⅰ A的原位剪切加工而防卫。

由于sarcotixin Ⅰ D和CM-Ⅱ是从麻蝇胚胎细胞系NIH-Sape-4中分离，而并未经过抗菌诱导，表明此族抗菌肽除了抗菌以外，还具有其他生理功能。同样，Nunbu等（1988）证明sarcotixin Ⅰ A的mRNA可在麻蝇胚胎期和蛹期表达，进一步证明了它们在不同生理环境下具有不同的生理功能。由于C-末端具有甘氨酸的肽比酰胺化的肽抗菌活性大为降低，而前者在胚胎细胞系中存在，故可能40氨基酸残基的sarcotixin Ⅰ刺激细胞生长和组织解离，而酰胺化的sarcotixin Ⅰ则抑制细菌。

#### 2.1.4 作用机制

sarcotixin Ⅰ的作用部位是细胞膜，扰乱膜电压的离子梯度，造成细胞内钾离子的大量流失，阻止由膜电压驱使的细胞对脯氨酸的吸收。试验表明，通过基质磷酸化合成ATP的大肠杆菌变种uncA对sarcotixin Ⅰ敏感性很低，而正常大肠杆菌则相当敏感，推测sarcotixin Ⅰ对细菌致死的主要原因是扰乱细胞膜离子梯度，引起细菌体内ATP的短缺。

### 2.2 果蝇的天蚕素

Kylsten等（1990）从果蝇中分离出了3个表达抗菌肽的基因，称为A1、A2和B。这3个基因可读框均很小，大约长为350个核苷酸，转录产物也很小，它们与sarcotoxin Ⅰ的氨基酸序列非常相似，同源率较高。

天蚕素类抗菌肽只存在于鳞翅目昆虫和双翅目昆虫中，故这类抗菌肽可能是进化得最晚的1类。它们可能在Triassic早期，当双翅目和鳞翅目分枝从内生翅类中分化后才进化形成。

## 第二节 环状抗菌肽族

环状的抗菌肽的所有种类均含有分子内双硫键。这1族中研究得最为清楚的亚族是防卫素（defensins）或麻蝇防卫素（sapecins）。防卫素的分子量大小约为4 000u，具有2～3个分子内双硫键。主要生物活性是抑制革兰氏阳性菌。该肽族中还包括果蝇防卫素（drosomycin），分子量为5 000u，具有4个分子内二硫键；刺蝽防卫素（tyhanatin），分子量为2 000u，具有1个分子内二硫键。thanatin具有广谱抗菌作用，既能抑制革兰氏阴性和阳性细菌，又能抑制真菌的生长。

### 1 防卫素

昆虫防卫素首先由Matsuyama等（1988）从棕尾别麻蝇中分离到，故命名为麻蝇防卫素（sapecin）。不久，Lambert等（1989）从新陆原绿蝇（*Phormia terranovae*）中也分离到这亚族的抗菌肽。由于其结构与兔肺巨噬细胞中的防卫素（具有33个氨基酸残基，6个半胱氨酸形成3个分子内二硫键）相似，因此称为昆虫防卫素。这是研究最为广泛的抗菌肽类。在外翅类昆虫（半翅目和蜻蜓目）和内翅类昆虫（双翅目、鞘翅目、毛翅目和膜

翅目）中均存在。它们的主要生物活性是抑制革兰氏阳性菌，但有的防卫素也抑制革兰氏阴性菌和真菌。所有昆虫防卫素均具有 6 个半胱氨酸，组成 3 个分子内二硫键。根据 Chernysh 等（1996）的统计结果，至少有 15 种防卫素从昆虫中分离出来。迄今为止，分离出的防卫素应在 20 种以上（表 9-5），包括双翅目（*P. terranovae*、*S. peregrina*、*D. melanogaster*、*Eristalis tenax*、*Aedes aegyptii*）、鞘翅目（*Zophobas atratus*、*Tenebrio molitor*）、膜翅目（*Apis mellifera*、*B. pascuorum*）、毛翅目（*Limnephilus stigma*）、半翅目（*Pyrrhocoris apterus*、*Palomena prasina*）和蜻蜓目（*Aeschna cyanea*）。在蝎（*Leiurus quinquestriatus*）中也分离出防卫素。此外，防卫素也广泛存在于高等动物之中。但防卫素却不存在于鳞翅目昆虫中（图 9-3）。

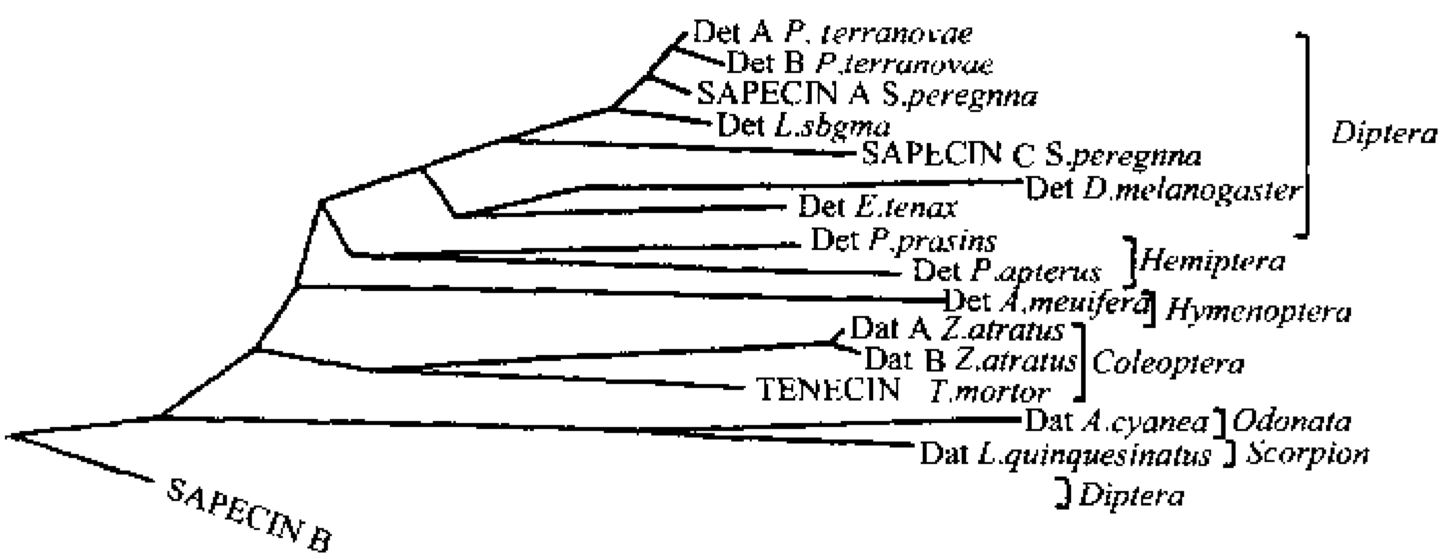



图 9-3 昆虫与蝎防卫素的系统树

（仿 Chernysh 等，1996）

**表 9-5 常见昆虫的防卫素**

| 虫种及防卫素 | 氨基酸序列 | | | |
|---|---|---|---|---|
| *P. terranovae*B | ATCDLLS | GTGINHSACAAHCL | LRGNRGGYCNG | KGVCVCRN |
| B | ATCDLLS | GTGINHSACAAHCL | LRGNRGGYCNG | KGVCVCRN |
| *S. peregrina sapecin*A | ATCDLLS | GTGINHSACAAHCL | LRGNRGGYCNG | KAVCVCRN |
| *B* | ATCDLLS | GIGVQHSACALHCV | FRGNRGGYCTG | KAICVCRN |
| *E. tenax* | ATCDLLS | FLNVNHAACAAHCL | SKGYRGGYCDG | KKVCNCR |
| *D. melanogaster* | ATCDLLS | KWNWNHTACAGHCI | AKGFKGGYCND | KAVCVCRN |
| *L. stinaga* | ATCDLLS | GTGVGHSACAAHCL | LRGNRGGYCNG | KAVCVCRN |
| *A. mellifere* | VTCDLLSF | KGQVNDSACAANCL | SLGKAGGHCE | KGICLCRKTTFKFLWDKRF - $NH_2$ |
| roylisin | VTCDLLSF | KGQVNDSACAANCL | SLGKAGGNCE | KGICLCRKTTFKELWDKRF |
| *B. pascuorum* | VTCDLLSI | KGVAEHSACAANCL | SMGKAGGRCE | NGICLCRKTTFKFLWDKRF - $NH_2$ |
| *Z. atratus*A | FTCDVLGFEIAGTKLNSAACGAHCL | | ALGRRGGYCNS | KSVCVCR |
| B | FTCDVLGFEIAGTKLNSAACGAHCL | | ALGRTGGYCNS | KSVCVCR |
| *T. molitor Tenecin* I | VTCDILSVEAKGVKLNDAACAAHCL | | FRGRSGGYCNS | KRVCVCR |
| *P. apterus* | ATCDILSFQSQWVTPNHAGCALHCV | | IKGYKGGQCKI | TVCHCRR |
| *P. prasina* | ATCDALSFSSKVLTVNHSACAIHCL | | TKGYKGGKCVN | TICNCRN |
| *A. cyaneu* | GFGCP LD Q | | MQCHRHCQTITGRSGGYCSGPLKLTCTCYR | |
| *L. quinquestriatus* | GFGCP LN Q | | GACHRHCRSIR RRGGYCAGFFKQTCTCYRN | |
| *S. peregrina* sapecin B | LTCE ID | | RSLCLLHCR LKGYLRAYCSQ QK VCRCVQ | |

### 1.1 麻蝇防卫素

用麻蝇防卫素（sepecin）的 cDNA 经 Northern 杂交显示，当麻蝇幼虫用带菌的皮下注射器针头穿刺后，基因便被激活，可见麻蝇防卫素具有抗菌能力。此外，由于麻蝇防卫素最先由 Matsuyama 等（1988）从棕尾别麻蝇胚胎细胞系 NIH-Sape-4 中分离，此细胞系并未经免疫攻击，故因此推论它具有其他生理效应。进一步研究表明，当麻蝇处于胚胎期和蛹期时，麻蝇防卫素基因也被激活，表明它参与了昆虫的发育。Yamada 等（1993）发现，麻蝇防卫素可作为生长刺激因子，刺激胚胎细胞系 NIH-Sape-4 的增殖。可见，它具有抗菌和调节发育两重功能。

#### 1.1.1 化学结构

首先由 Matsuyama 等（1988）从棕尾别麻蝇中分离时，称为 sapecin A，具有 40 个氨基酸残基，每分子 sapecin A 电荷为 +3，属碱性肽。对革兰氏阳性和阴性菌均有效，但对阴性菌的效果稍差。sapecin A 与心磷脂的亲和力很强，心磷脂是细菌细胞膜上的酸性磷酸脂，推测麻蝇防卫素的作用方式是与细菌细胞膜结合，改变细胞膜的通透性，达到杀菌的目的。

Yamada 等（1993）又以金黄色酿脓葡萄球菌（*S. aureus*）IFO 12 732 菌株作为生物测定菌，对棕尾别麻蝇胚胎细胞系 NIH-Sape-4 再次分离，得到 2 个具有生物活性的抗菌肽。其中 1 个抗菌肽具有 40 个氨基酸残基，称为 sapecin C，它与 sapecin A 非常相似，对应位置的氨基酸只有 9 个不同，同源率达 78%；另 1 个抗菌肽具有 34 个氨基酸残基，与 sapecin A 的同源性差得多，34 个残基中只有 14 个相同，同源率仅为 41%。但其分子量和氨基酸序列与卡律蝎毒素（charybdotoxin）十分相似，命名为 sapecin B。同样，sapecin B 也具有 6 个半胱氨酸，形成 3 个分子内二硫键。

#### 1.1.2 编码 sapecin A 的 cDNA 克隆

由于 sapecin A 从胚胎细胞系中分离，未经任何免疫攻击，虽然具有广泛的抗菌能力，但其功能仍需研究。为此，Matsuyama 等(1988)以 sapecin A 等 28～34 位上的氨基酸序列 Gly-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Ala 为依据，合成了寡脱氧核苷酸探针，从 24 000 个来源于麻蝇 *Sarcophaga peregrina* 胚胎细胞系 NIH-Sape-4 中的 poly(A)RNA 的 cDNA 文库中筛选出了 37 个阳性克隆，从 37 个阳性克隆中，选择了与探针反应最为强烈的 pKM101，测定了插入片段的序列(图 9-4)。

这个克隆包含的插入片段大小为 0.6kb，具有 poly（dA）-poly（dT）和 poly（dG）-poly（dC）尾部。插入片段的可读框大小为 282 个核苷酸，编码 94 个氨基酸，sapecin A 的 40 个氨基酸位于可读框的后段。

在第 53 和 54 位，具有内切酶位点 Lys-Arg，此切点之后，即从 55～94 位，为 sapecin A 的氨基酸序列。疏水性的信号肽位于 N-端，比较此属昆虫其他信号肽的长短和结束氨基酸，信号肽应至 23 位的 Ala 结束。从 23～52 位，具有另一段包含 30 个氨基酸残基的肽，此肽的功能仍不清楚，因此，导出的具有 94 个氨基酸的肽应称为前原 sapecin A 肽，

```
GATCAGTGTCTTATAGACTTAGCTAAATATCACAACAAACTAAATTGTTTTTAACAAAAGTAATTAAAAA  70
AAATAAATTAAAAAAACCAAGAAA ATG AAA TCC TTC ATC GTA CTC GCT GTT ACC TTG TGC 129
                         Met Lys Ser Phe Ile Val Leu Ala Val Thr Leu Cys 12

TTG GCT GCC TTC TTT ATG GGT CAA TCC GTA GCC TCG CCT GCT GCA GCT GCT GAG 183
Leu Ala Ala Phe Phe Met Gly Gln Ser Val Ala Ser Pro Ala Ala Ala Ala Glu 30

GAA TCT AAA TTT GTT GAT GGT TTG CAT GCC TTA AAA ACT ATT GAA CCG GAA TTG 237
Glu Ser Lys Phe Val Asp Gly Leu His Ala Leu Lys Thr Ile Glu Pro Glu Leu 48

CAT GGC CGC TAC AAG AGA GCC ACT TGC GAT TTA TTG AGT GGC ACT GGC ATC AAT 291
His Gly Arg Tyr Lys Arg Ala Thr Cys Asp Leu Leu Ser Gly Thr Gly Ile Asn 66

CAC TCG GCT TGT GCT GCC CAT TGC TTG TTG AGA GGA AAT CGT GGC GGC TAT TGC 345
His Ser Ala Cys Ala Ala His Cys Leu Leu Arg Gly Asn Arg Gly Gly Tyr Cys 84

AAT GGC AAA GCT GTC TGC GTA TGT CGC AAT TAA GAAATCTTATTTTACATAGAAATAT   403
Asn Gly Lys Ala Val Cys Val Cys Arg Asn ***

AAAAATTATAATTAATAAAGTGATCACTTAAAGTATTAACAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   471
```

图 9-4 sapecin A 的 cDNA 序列及导出的前原 sapecin A 序列

(Matsuyama 等, 1988)

信号肽前端的非编码区具有 93 个核苷酸，3'-端非编码区具有 72 个核苷酸，poly (A) 的附加信号共有序列 AATAAA 位于 poly (A) 上游 25 个核苷酸处。

### 1.1.3 生物活性

选用革兰氏阴性和阳性代表菌进行了抑菌试验。研究表明，3 种麻蝇防卫素的抑菌谱基本相同，它们对大肠杆菌 K12、奇异变形杆菌 (*P.mirabilis*) IFO 3849、肺炎杆菌 (*K.pneumoniae*) ATCC21316 的半抑制浓度均 >20μmol，对金黄葡萄球菌 (*S.aureus*) ATCC65388 和表皮葡萄球菌 (*S.epidermidis*) IFO 3762 为 0.5～1.6μmol，对金黄葡萄球菌 MR3626、MR1550、MR1587、NR3636 活性较差，对犬血链球菌 (*S.sanguis*) ST3、唾液链球菌 (*S.salivarius*) HHT、短链球菌 (*S.bovis*) ATCC27960 为 0.7～6.6μmol，而对巨大芽孢杆菌 (*B.megaterium*) IAM1166、环状芽孢杆菌 (*B.circulans*) IFO3 976 和棒状杆菌属的 *C.glutamicum* 活性最强，均 <0.2μmol。3 种麻蝇防卫素中，以 sapecin C 活性最强，而以 sapecin B 稍弱。

Matsuyama 等(1988)从经过免疫攻击的 3 龄幼虫体内提取总 RNA(T-RNA)，电泳后封闭于硝酸纤维素滤纸上，用来自 pKM101 切口平移片段 Sau3AI-Sau3AT(含 424 个碱基对)探针杂交，这 1 探针包含编码 sapecin A 的所有核苷酸。结果表明，遭受免疫攻击的 3 龄幼虫具有大小为 630 碱基的杂交带，而正常幼虫无。可见，sapecin A 基因被免疫攻击激活，sapecin A 无疑是抗菌肽。收集血淋巴、脂肪体和其他组织，抽提出总 RNA 后电泳，再用来自 pKM101 切口平移片段 Sau3AI-Sau3AI 包含编码 sapecin A 的所有核苷酸的探针杂交。结果表明，阳性反应主要位于血细胞中，在脂肪体和其他组织中也有不同程度的表达。在惜古比天蚕蛾中，受伤的幼虫体内的血细胞常粘附在其他组织上，很难从其他组织上洗脱。故此处测定的脂肪体和其他组织的阳性反应可能来自粘附于这些组织上的血细胞。

采用同样的方法，Matsuyama 等 (1988) 发现 sapecin A 的 mRNA 在胚胎发育期存

在，在胚胎发育第10d浓度最高，到12d时显著下降。这与sapecin A存在于麻蝇胚胎细胞系NIH-Sape-4中的试验结果相一致，对蛹的测定结果表明，在蛹第2d时大量sapecinA的mRNA积累，随后逐步下降，到蛹第5d时，已经检测不到。sapecin A基因在胚胎发育期和蛹早期的瞬时表达说明，sapecin A的存在可能对移除旧组织，组建新组织均具有重要意义。此外，很多高等动物的生长刺激肽具有6个半胱氨酸，结构与sapecin A相似，因此sapecin A在胚胎期和蛹早期出现可能具有刺激某些组织生长的作用。

## 1.2 绿蝇防卫素

### 1.2.1 化学结构

Lambert等（1989）从新陆原绿蝇（*Phormia terranovae*）3龄幼虫中获得了1种绿蝇防卫素（phomicin）。对处理幼虫的血淋巴进行生测，去除细胞的血淋巴对革兰氏阳性菌藤黄细球菌（*M. luteus*）具有强烈抑制活性，而未处理的3龄幼虫血淋巴无抑菌活性。这一抑制因子在酸性条件下热稳定，若用蛋白酶处理血淋巴，抑菌活性完全消失。表明抑菌因子为肽类。

收集处理3龄幼虫的血淋巴，经热处理后，上清液经离子交换层析，抑菌因子存在于水相中，经Sep-Pak柱后，再用反相高效液相色谱纯化。发现抑菌因子有2个峰，分别称为肽A和肽B。纯化的抑菌因子含有17种氨基酸，无脯氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸或谷氨酸残基，甘氨酸和半胱氨酸含量丰富，分别为7个和6个。天然肽经Edman降解测序表明，绿蝇防卫素由40个氨基酸残基组成。肽A和B仅有1个氨基酸不同，肽A第32位上是甘氨酸，而肽B是精氨酸。质谱分析说明，肽链中的6个半胱氨酸形成3个二硫键。

### 1.2.2 作用方式

对新陆原绿蝇防卫素的生测表明，肽A抑制革兰氏阳性菌，对藤黄细球菌（*M. luteus*），巨大芽孢杆菌（*B. megaterium*）活性最强，对枯草杆菌（*B. subtilis*）有较低的活性。对金黄色酿脓葡萄球菌（*S. aureus*）和苏云金杆菌（*B. thuringiensis*）完全无效。0.5μm的肽A与藤黄细球菌一起培养时，15min后引起了原生质体的裂解，表明绿蝇防卫素的作用部位为细菌细胞膜。

进一步的研究表明，绿蝇防卫素杀灭革兰氏阳性菌的原理是破坏细胞膜的渗透性屏障，使大量钾离子外渗，这带动了其他离子的外渗。同时，绿蝇防卫素降低细胞膜上的ATP，抑制细菌的呼吸（Cociancich et al，1993）。

## 1.3 蜜蜂防卫素

很早以前人们便知道来源于意大利蜜蜂咽腺的王浆具有抗菌能力。McCleskey等（1938）证实王浆对革兰氏阳性和阴性菌均具有显著抑制作用，随后的研究发现王浆还具有杀死放线菌、霉菌和其他真菌的活性。直到1990年，才由Fujiwara及其同事采用现代生化技术鉴定出了蜜蜂防卫素或称王浆素（roylisin），这是1个具有51个氨基酸的肽，分子量大于昆虫防卫素，静电荷为+2。

亲水性测定结果表明，王浆素为两亲性分子。N-端（1—9位）是疏水性的，而C-端

(23～45 位）则具有很强亲水性，具有大量带电荷的氨基酸，特别是 26，33，39，44 和 49 位上的赖氨酸，带电荷数较多。

分离的王浆素的抗菌谱不如天然王浆广泛，主要抑制革兰氏阳性菌，对梭状芽孢杆菌属、棒状杆菌属、明串珠菌属、葡萄球菌属和链球菌属的菌类有效抑制剂量为 1μmol，而对革兰氏阴性菌活性低。王浆素对高温稳定，加热至 100℃ 15min 仍保持活性，但其活性可被内肽酶和精氨酸 C-端内切蛋白酶破坏。

王浆素可能具有 3 个方面的作用：①随王浆进入蜜蜂肠道后，杀死进入肠道的微生物，起保护作用；②在王浆贮存过程中起保护作用，阻止微生物的分解；③具有胰岛素类似物的结构和功能，可与鼠肝胰岛素受体结合，抑制常数为 45%。此外，王浆素与哺乳动物表皮生长因子相似，后者具有 53 个氨基酸残基，3 个分子内二硫键，因而王浆素也很可能具有刺激幼虫生长的功能。

另 1 种蜜蜂防卫素由 Casteels-Josson 等（1994）发现，对遭受了免疫攻击的意大利蜜蜂血淋巴的生测结果表明，除了 apidaecin、abaecin 和 hymenoptaecin 以外，还有 1 种含量只有上述 3 种抗菌肽 1/20～1/50 浓度的新肽存在，N-端的结构测定表明，它与王浆素完全一致，进一步对此肽分析，用 Edman 降解测序结果表明，这一新肽也具有 51 个氨基酸，与王浆素相比，只有 50 位的 1 个氨基酸不同，王浆素 50 位的酪氨酸被蜜蜂防卫素的精氨酸替代，两种防卫素的氨基酸同源率达到 98%。

Casteels-Josson 等（1994）应用 PCR 扩增技术，5' RACE 技术和建立 cDNA 文库的方法，得到了蜜蜂防卫素的 cDNA 序列。两个克隆出的蜜蜂防卫素 cDNA 完全相同（图 9-5）。

```
ATTGGTCAGACACTTCTCAGTTTTTTCGAATAGTTTGAATATCTATTGAAGTTTAACACGTATTTAGCCA  70
AT ATG AAA ATC TAT TTT ATT GTC GGC CTT CTC TTC ATG GCT ATG GTT GCT ATC  123
   Met Lys Ile Tyr Phe Ile Val Gly Leu Leu Phe Met Ala Met Val Ala Ile  17

ATG GCT GCA CCT GTT GAG GAT GAA TTC GAG CCA CTT GAG CAT TTT GAG AAT GAA 177
Met Ala Ala Pro Val Glu Asp Glu Phe Glu Pro Leu Glu His Phe Glu Asn Glu 35

GAA CGT GCC GAC AGA CAT AGA AGA GTA ACT TGT GAC CTT CTC TCA TTC AAA GGA 231
Glu Arg Ala Asp Arg His Arg Arg Val Thr Cys Asp Leu Leu Ser Phe Lys Gly 53

CAA GTT AAT GAC AGT GCT TGC GCT GCT AAC TGT CTC AGT TTG GGT AAA GCT GGA 285
Gln Val Asn Asp Ser Ala Cys Ala Ala Asn Cys Leu Ser Leu Gly Lys Ala Gly 71

GGT CAT TGC GAG AAA GTT GGA TGT ATT TGT CGA AAA ACC AGT TTC AAA GAT CTC 339
Gly His Cys Glu Lys Gly Val Cys Ile Cys Arg Lys Thr Ser Phe Lys Asp Leu 89

TGG GAC AAA CGT TTC GGT TAA GTGCCATTATGAAGATTCAACGATGAAATTTTTTAACAAAAA  404
Val Asp Lys Arg Phe Gly ***                                              95

ATATGAAAACGCGAAATGATTAAGAAATGAAAAATGAAAACTGTATTATCATTGAAAATTCTATGAACTTT 475
AATTTACTTATTTAATAAATAATATAAGTAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 546
AAAAAAAAAAAA                                                            558
```

图 9-5 蜜蜂防卫素 cDNA 序列及导出的前原蜜蜂防卫素序列

（Casteels-Josson 等，1994）

起始密码子在核苷酸73～75位，终止密码子在338～340位，最大可读框编码氨基酸95个，影响转录稳定性的序列ATTTA位于Poly（A）上游20位处。其中信号肽可能有两个剪切位置，分别位于19和21位氨基酸处，故信号肽长度为19个氨基酸或21个氨基酸，从20或22位氨基酸到43位氨基酸的1段肽功能未知。蜜蜂的defencin从44位氨基酸到94位氨基酸，全长51个氨基酸残基，第95位氨基酸为甘氨酸，表明成熟的蜜蜂防卫素的C-末端可能酰胺化。由于编码的这一段肽具有信号肽、前导序列和功能肽，故这段肽是蜜蜂防卫素的前原肽。

### 1.4 欧洲熊蜂防卫素

Rees等（1997）将大肠杆菌（*E.coli* NCO9001）注射进入欧洲熊蜂（*Bombus pascuorum*）体液中，注射后24h在欧洲熊蜂血淋巴中诱导出很强的抗菌活性。从血淋巴中分离的抗菌组分之一经Edman降解测序，结果表明这个肽含有45个氨基酸残基，在3，17，21，31，36和38位上反应空白。故对此肽还原和烷基化后，对吡啶基乙基化产物用内切蛋白酶Glu-C酶切（1种将肽类从谷氨酸处切开的酶），剪切后形成4个肽段，每段再经Edman降解测序，得到了此肽的全序列，6个空白位均由半胱氨酸占据。

电喷射质谱分析表明，此肽具有3种分子量，1种为5 529.1u，比理论分子量（5536.5u）少7.4u，这可能由此肽中的6个半胱氨酸形成3个二硫键时减少6个氢原子（－6u）和C-末端酰胺化（-1u）造成；另1种分子量为5 545.6u，比理论分子量多16.5u，这可能由某氨基酸的氧化造成，这一氧化氨基酸可能是Try（47位），Met（24位）或Lys（9，26，40，44，49位）；第3种分子量为5 586.9u，比理论分子量多57.8u，这1分子量可能由C-末端多1个甘氨酸残基造成。测定这3种分子的丰度表明，以酰胺化的分子含量最多。采用MALDI-TOF-MS进一步分析证实，此肽的C-末端已酰胺化。

此抗菌肽对藤黄细球菌（*M.luteus*）（94%抑菌率）和大肠杆菌（*E.coli*）（100%抑菌率）均具有强烈的抑制作用。

### 1.5 碧蝽防卫素

Chernysh等（1996）将加热杀死的细菌注射到红尾碧蝽（*Palomena prasina*）中，血淋巴中诱导出几种抗菌成分，其中从尺寸排阻层析柱上用50%乙腈酸水溶液洗提出的成分具有抑制革兰氏阴性和阳性菌的活性，分子量在4～6×10$^3$u之间，进一步由反相高效液相色谱纯化，被32%乙腈酸水溶液洗提。用Edman测序得到10个氨基酸序列，其中具有1位空白信号。用4-乙酰吡啶将此肽还原并烷基化后，吡啶乙基化肽再经Edman降解测序，得到1个具有43个氨基酸残基的肽，由于没有其他信号的存在，故认为这一序列是完整的。

这一具有43个残基的肽含有6个半胱氨酸，结构与昆虫防卫素非常相似，故被称碧蝽防卫素，由质谱分析结果表明，其分子量为4 614.2u，与理论分子量4 620.3u相差6u，表明6个半胱氨酸均失去了1氢原子，形成了3个分子内二硫键。

## 1.6 红蝽防卫素

Cociancich 等（1994）从经过免疫攻击的无膜翅红蝽（*Pyrrhocoris apterus*）中分离出红蝽防卫素。这是 1 个具有 43 个残基的多肽，也和其他防卫素一样，具有 6 个半胱氨酸残基。质谱测定分子量为 4 729.3u，与理论计算分子量 4 733.5u 相差 5.2u，可见，这 6 个半胱氨酸形成了 3 个双硫键。

测定了革兰氏阳性菌藤黄细球菌（*M.leteus*）、巨大芽孢杆菌（*B.megaterum*）、*A.viridans*、金黄色酿脓葡萄球菌（*S.aureus*）、腐物寄生性链球菌（*S.saprophyticus*）、枯草杆菌（*B.subtilis*）OB935、乳酸小球菌（*P.acido lactici*）、苏云金杆菌（*B.thuringiensis*）和绵羊李司忒氏菌（*L.moncytogenes*）；革兰氏阴性菌大肠杆菌（*E.coli*）D22 和 1106、肠杆菌 *E.clacae* β 12、绿脓杆菌（*P.aeruginosa*）A.T.C.C.82118、鼠伤寒沙门氏菌（*S.typhimurium*）、肺炎杆菌（*K.pneumoniae*）、黏质沙雷氏菌（*S.marcescans*）Db11、粪产碱杆菌（*A.taecalis*）、黄单胞杆菌 *X.campestris* pv *orizae* 和欧文氏菌（*E.carotovora carotovora*）对红蝽防卫素的反应。结果表明，红蝽防卫素对前面 4 种革兰氏阳性菌活性最高，最小抑制浓度范围为 0.15～2.5μmol，对随后的两种革兰氏阳性菌为 2.5～5μmol，而对苏云金杆菌和绵羊李司忒氏菌，最小抑制浓度达 5μmol 以上。红蝽防卫素对革兰氏阴性菌活性稍差，对大肠杆菌 D22 最小抑制浓度2.5～5μmol，对其他菌种或菌株最小抑制浓度均达 5μmol 以上，甚至无效。

将藤黄细球菌（*M.luteus*）与 1μmol 红蝽防卫素接触 1min 后，便足以杀死所有菌体，表明红蝽防卫素为杀菌剂而不是抑菌剂。

## 1.7 鞘翅防卫素

Bulem 等（1991）将加热杀死的细菌注射至鞘翅目昆虫 *Zophobas atratus* 的 3 龄幼虫体内，间隔一定时间后收集血淋巴用革兰氏阳性菌藤黄细球菌（*M.luteus*）检测抗菌活性，结果表明，诱导后 12h 能测到显著的抗菌活性，这一抗菌活性可保持到 72h，之后开始下降，但较为缓慢，直至 4 星期后，抗菌活性仍显著高于对照。采用革兰氏阴性菌大肠杆菌 D22 和 D31 检测，得到同样的结果，当用蛋白酶处理血清后再检测，抗菌活性消失，表明抗菌成分为肽类。

进一步分离纯化经免疫攻击的血清，得到 3 个抗菌成分，成分 B 和 C 经前处理后，Edman 降解测序，得到了具有 43 个氨基酸残基的 2 种防卫素，分别称为防卫素 A 和 B。这 2 种防卫素除了 30 位上 A 为精氨酸，B 为苏氨酸外，其他氨基酸均一致，同源率达 98%。2 种防卫素均为碱性肽，其中 A 的 pI 为 8.2，而 B 的为 7.9。

采用平板生长抑制生测法，测定了防卫素对 11 种 13 个株系的革兰氏阴性菌和 12 种革兰氏阳性菌的抑制活性。在革兰氏阴性菌中，防卫素对大肠杆菌 D22 最具活性，对其他菌种和株系无效；在革兰氏阳性菌中，防卫素对藤黄细球菌（*M.leteus*）最具活性，其次为酿脓链球菌（*S.pyogenes*）和枯草杆菌（*B.subtilos*）QB935，再次为杆状菌 C.D2，而对其他菌种无活性。

## 1.8　刺蝽防卫素

### 1.8.1　化学组成

Felbaum 等（1996）从半翅目昆虫斑腹刺益蝽（*Podisus maculiventris*）中分离到 1 种抗菌肽，命名刺蝽防卫素（thanatin），斑腹刺益蝽用加热失活的大肠杆菌诱导收集到对大肠杆菌和藤黄细球菌具有抑制作用的血淋巴，脱细胞的血淋巴经纯化后，得到 1 个具有广谱抗菌性的肽。此肽经 Edman 降解测序具有 21 个氨基酸，含有 2 个半胱氨酸。测定分子量（2 434.4u）与理论分子量（2 436.2u）相差 2u，若 2 个半胱氨酸通过分子内二硫键相连，脱去 2 个氢原子，则与实测分子量相符。此肽具有大量阳离子（pI10.48），可耐受 pH 变化（pH2～10）。此肽从 11～18 位形成一个环。该环由 11 和 18 位的 2 个半胱氨酸通过二硫键键合，环内含有 6 个氨基酸，强碱性（图 9-6）。

GSKKPVPIIYCNRRTGKCQRM

图 9-6　刺蝽防卫素的氨基酸一级结构
（Felbaum 等，1996）

此肽与已经分离纯化的所有昆虫抗菌肽均不同源，而与从各种青蛙皮肤中分离的 brevinins 相似。与从 *Rana brevipoda* 中分离出的 Brevinin 1 同源率达 47.6%。这 2 种肽均具有 2 个半胱氨酸，在 C-末端（brevinin1）和近 C-末端（thanatin）形成 1 个 6 元（thanatin）和 5 元（brevinin 1）环，此环被苏氨酸从中间分为 2 个部分，一边为 Arg-Arg 或 Lys-Lys，另一边为 Lys 连接 Gly 或 Ile。相似的环状结构，即由 2 个半胱氨酸键合而成，环内由苏氨酸或丝氨酸分成 2 个部分，在蛙类的其他抗菌肽，如 brevinin 2、esculentins、gaegurins、ranalexin 中均存在，因而被称为 Rana 环。昆虫环与 Rana 环的区别在于环中增加了 1 个天冬酰胺，因而形成 6 元环。

### 1.8.2　抗菌活性

Thanatin 抗菌谱很广，对革兰氏阴性菌鼠伤寒沙门氏菌（*S. typhimurium*）、大肠杆菌（*E. coli*）、肺炎杆菌（*K. pneumoniae*）活性最强（最小抑制浓度 MIC＜1.2μmol），对欧文氏菌（*Erwinia carotovora*）（MIC 10～20μmol）、绿脓杆菌（*P. aeruginosa*）（MIC20～40μmol）活性中等。对革兰氏阳性菌 *Aerococcus viridans*、巨大芽孢杆菌（*B. megaterium*）和枯草杆菌（*B. subtilis*）活性最强（MIC＜5μmol），对乳酸小球菌（*P. acidolactici*）活性中等（MIC20～40μmol），而对金黄色酿脓葡萄球菌（*S. aureus*）无活性。

Thanatin 对真菌也具有很强的抑制活性。研究表明，它对链孢霉菌 *N. crassa*、葡萄孢菌 *B. cinerea*、丛赤壳菌 *N. haematococca*、木霉菌 *T. viride*、链格孢菌 *A. brassicola* 和镰刀菌 *F. culmorium* 的最小抑制浓度＜5μmol，对 *Ascohyta pisi* 和镰刀菌 *F. oxyporum* 的最小抑制浓度＜20μmol。对人的致病真菌 *A. fumigatus* 和 *T. mentagrophytes* 也有一定的抑制作用。

### 1.8.3　作用方式

用猪的红血细胞进行的生测结果表明，thanatin 无溶血作用。10μmol 的 thanatin 与大

肠杆菌温育，4h后引起大部分D31和1 106株系的失活，24h后全部杀死。类似的结果也在其他敏感性菌种中得到。

Thanatin的初级作用是吸附。thanatin在加入的第1S内，便能吸附到移动的大肠杆菌上。紧接着是凝集成团块，细菌的凝集通过菌液对600nm光的散射测得。测定结果表明，thanatin能引起大肠杆菌1 106、D31和藤黄细球菌的凝集，但阈值各不相同。大肠杆菌只需8μmol，藤黄细球菌则需20μmol。且凝集阈值受离子强度的影响，在10mmol的NaCl水溶液中，大肠杆菌的凝集阈值只需2μmol，在1mmol的NaCl水溶液中，凝集阈值需8μmol。若加入1mmol的$CaCl_2$，凝集团块解离。thanatin具有1个强碱性的6元环，此环与带负电的脂多糖细胞壁结合后，中和细菌表面电荷，减小细胞之间的静电斥力，从而造成细菌的凝集。

将thanatin与大肠杆菌一起温育，用特制钾电极测定进入细胞中的钾量，结果表明，tnanatin并不增加钾离子的穿透量。用相似的方法证明，thanatin也不增加氢离子对藤黄细球菌细胞膜的透过量。以上测定表明，细胞膜不是thanatin的作用靶标。用Clark电极测定thanatin对大肠杆菌和藤黄细球菌呼吸的影响，结果表明，加入后1h呼吸开始下降，至6h后已完全检测不到。这一结果证实了thanatin的杀菌能力。

将thanatin与真菌链孢霉菌*N.crassa*一起温育，48h后将孢子移入无thanatin的环境中，再过48h检查，未发现有孢子恢复活性，表明thanatin也是一种杀真菌剂。

## 1.9 果蝇防卫素

### 1.9.1 化学结构

Fehlbaum等（1994）从果蝇中获得1种抗菌肽，命名为果蝇防卫素（drosomycin）用带菌的昆虫针刺入虫体诱导抗菌肽的方法，处理了2 000头俄勒冈果蝇（*Drosophila oregon*）1日龄雄虫，分离的血淋巴与对照血淋巴分别经Sep-Pak C18柱，用10%、30%和80%酸化乙腈洗提，再用反相高效液相色谱测定，在30%乙腈洗提物中发现了1个与对照完全不同的抗菌峰，此峰经Edman降解测序后，得到1个43个氨基酸的肽，具有7个无信号空位。

为了确定无信号空位的氨基酸种类，将这种肽的纯化物用4-乙烯吡啶还原并烷基化，然而再进行Edman降解测序，得到了1个44氨基酸残基的肽，此肽具有8个半胱氨酸，其中1个半胱氨酸位于C-端的最末端。这个半胱氨酸残基在未烷基化时，Edman测序检测不到，故直接测序时只具有43个氨基酸。

用电喷射质谱仪测定了果蝇防卫素天然肽的分子量，其值为4 889.1u，而根据测定的氨基酸序列计算的理论分子量为4 897.5u，两者相差8u。这表明天然肽的8个半胱氨酸均脱去了1个氢原子，形成4个分子间二硫键。离子化程度很小（pI为7.8），对蛋白酶降解、加热和pH变化均具有较强抵抗力。

在昆虫中，仍未发现与drosomycin结构相似的抗菌肽。但在十字花科植物中，最近发现其种子中具有与此相似的抗菌肽。从*Raphanus sastivus*种子中分离的Rs-AFP2与果蝇肽非常相似，它们都具有8个半胱氨酸，均在分子内形成4个二硫键，其中1个半胱氨

酸均位于C链的最末端，两个肽的氨基酸同源率达到38%。

### 1.9.2 cDNA的分离

由分离的果蝇防卫素的氨基酸序列，设计了简并寡核苷酸探针，对源自诱导果蝇mRNA建立的cDNA文库进行筛选，得到了120个阳性克隆。随机选择4个阳性克隆进行了cDNA序列分析，结果表明，这4个阳性克隆的cDNA序列完全一致。它们都由373个碱基组成（除去Poly A尾段），具有1个包含70个密码子的可读框，可读框以2个甲硫氨酸密码开始，以终止密码子结束（图9-7）。

```
GATAATTCAAACAGAAATCATTTACCAAGCTCCGTGAGAACCTTTTCCAAT ATG ATG CAG ATC AAG 66
                                                    Met Met Gln Ile Lys 5

TAC TTG TTC GCC CTC TTC GCT GTC CTG ATG CTG GTG GTC CTG GGA GCC AAC GAG 120
Tyr Leu Phe Ala Leu Phe Ala Val Leu Met Leu Val Val Leu Gly Ala Asn Glu 23

GCC GAT GCC GAC TGC CTG TCC GGA AGA TAC AAG GGT CCC TGT GCC GTC TGG GAC 174
Ala Asp Ala Asp Cys Leu Ser Gly Arg Tyr Lys Gly Pro Cys Ala Val Try Asp 41

AAC GAG ACC TGT CGT CGT GTG TGC AAG GAG GAG GGA CGC TCC AGT GGC CAC TGC 228
Asn Glu Thr Cys Arg Arg Val Cys Lys Glu Glu Gly Arg Ser Ser Gly His Cys 59

AGC CCC AGT CTG AAG TGC TGG TGC GAA GGA TGC TAA ATCCCATGAGCAATTAGCATGAA 287
Ser Pro Ser Leu Lys Cys Try Cys Glu Gly Cys ***                         70

CGTTCTGAAAAGCGCGTTTAGCTCTCCACTACTTACGACATATTCTATGCTGCAATATTGAAAACTAATAA 358
ACAAAATGTACATT(A)38                                                     373
```

图9-7 果蝇防卫素的cDNA序列及导出的原肽

（Fehlbaum等，1994）

具有44个氨基酸残基的drosomycin从第27个氨基酸开始，至终止密码子前即第70个氨基酸结束，从cDNA推导出的氨基酸序列与由Edman降解分析出的完全相同。cDNA编码的前21个氨基酸为非极性的信号肽，Ala-21位是1个潜在的酶切位点。此外，Ala-24和Ala-26是另外2个潜在的酶切位点。若内切酶从21位剪切，则还需二肽氨肽酶的再次剪切才能形成成熟的drosomycin。

### 1.9.3 表达部位

用Northern杂交技术测定了drosomycin在经细菌感染或未处理的果蝇中的表达程度。无论在幼虫、蛹还是成虫中，未处理的果蝇均有一定的表达，而处理的果蝇的表达程度大大提高。

用地高辛配基标记的cDNA，对用石蜡包埋的处理和未处理的幼虫和成虫原位杂交，切片观察表明，强烈的阳性反应存在于处理幼虫和成虫的脂肪体内。在未处理的幼虫和成虫脂肪体中，也具有较弱的阳性反应。

### 1.9.4 抗菌活性

对天然的drosomycin进行了抗菌测定。测定范围包括抗细菌、抗真菌和溶血等活性。

结果表明，drosomycin 在浓度 1～20μ mol 范围内对革兰氏阴性菌和阳性菌均无活性，测定菌种包括巨大芽孢杆菌、藤黄细球菌、金黄色酿脓葡萄球菌、犬血链球菌（*S.sanguis*）、无乳链球菌（*S.agalatae*）、*P.cepacia*、肠杆菌（*E.cloacae*）和大肠杆菌；drosomycin 对牛红细胞也无溶血作用；相反，对测定的 8 种真菌均具有强大的抑制活性。它们的抑制中浓度分别为：链孢霉菌（*N.crasaa*）0.6μ mol，葡萄孢菌（*B.cinerea*）1.2μ mol，镰刀菌（*F.culmorus*）1.0μ mol，链格孢菌（*A.brassicola*）0.9μ mol，链格孢菌（*A.longipes*）1.4μ mol，丛赤壳菌（*N.haematococca*）1.8μ mol，镰刀菌（*F.oxysporum*）4.2μ mol，*A.pisi*（3.2μ mol）。Drosomycin 对真菌生长的抑制还用显微镜进行了观察，当浓度达 10μ mol 以上时，可完全抑制孢子的萌发，没有菌丝生长。

低浓度的 drosomycin 延缓真菌菌丝的生长，而且菌丝的形状异常。葡萄孢菌的菌丝在 1.2μ mol 时，细胞内原生质沿菌丝方向挤出，表明蛋白质被部分裂解。

链孢霉菌孢子在 0.1～10um 的 drosomycin 下培养 48h 后，将孢子移至无 drosomycin 的培养基中继续培养，48h 后检查，未见任何恢复生长的孢子。说明 drosomycin 是杀真菌剂而非生长抑制剂

## 2 防卫素的结构与进化

### 2.1 防卫素双硫键的连接方式

防卫素最先由高等动物中分离，广泛存在于多型核嗜中性白细胞之中。在其他组织中也有分布。如 NP1 和 NP2 存在于兔肺巨噬细胞中，防卫素类似物 cryptdin 存在于肠囊细胞中。目前已分离的动物防卫素超过 16 种，它们的半胱氨酸均处于相似的位置（表 9-6）。

表 9-6 动物防卫素的种类

| 动物 | 肽类俗名 | 氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 人 | HNP1 | ACYCRIP ACIAGERRYGTCTYQGRLWAFCC |
| | HNP2 | CYCRIP ACIAGERRYGTCTYQGRLWAFCC |
| | HNP3 | DCYCRIP ACIAGERRYGTCTYQGRLWAFCC |
| | HNP4 | VCSCRIP FCRRTELRVGMCTIQGVSETYCCTRV |
| 豚鼠 | GPNP | RRCICTTR TCRFPYRRLGTCIFQNRVYTFCC |
| 兔 | NP1 | VVCACRRA LCLPPERRAGFCRIRGRIHPLCCRR |
| | NP2 | VVCACRRA LCLPLERRAGFCRIRGRIHPLCCRR |
| | NP3A | GICACRRR FCPNCERFSGYCRVNGARYVRCCSRR |
| | NP3B | GRCVCRKQLLCSYRERRIGDCKIRGVRFPFCCPR |
| | NP4 | VSCTCRRF SCGFGERASGSCTVNGVRHTLCCRR |
| | NP5 | VFCTCRGF LCGSGERASGSCTINGVRHTLCCRR |
| 鼠 | RatNP1 | VTCYCRRT RCGFRERLSGACGYRGRIYRLCCR |
| | RatNP2 | VTCYCRST RCGFRERLSGACGYRGRIYRLCCR |
| | RatNP3 | CSCRTS SCRFGERLSGACRLNGRIYRLCC |
| | RatNP4 | ACYCRIG ACVSGERLTGACGLNGRIYRLCCR |
| 鼠 | Cryptdin | VCYCRSR GCKGRERMNGTCRKGHLLYTLCCR |

Selsted 等（1989）采用化学方法研究了动物防卫素的二硫键连接方式，研究结果表明，若将动物防卫素的 6 个半胱氨酸从 N-端到 C-端编号，则动物防卫素的 3 个分子内的

二硫键的连接方式为1-6，2-4和3-5，随后他们又采用双向核磁共振对动物防卫素进行了进一步研究，证实了化学方法分析的结果。

昆虫防卫素与高等动物防卫素相比，虽然都具有6个半胱氨酸，但它们的位置存在着差异。在昆虫中，已发现的防卫素第2和第3半胱氨酸形成Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys结构，第5和第6半胱氨酸形成Cys-Xaa-Cys结构；而高等动物防卫素第1和第2半胱氨酸为Cys-Xaa-Cys结构，第5和第6半胱氨酸则形成二联体。这些差异预示着半胱氨酸形成二硫键时的连接方式也存在着差异。

Yamada等（1993）用内肽酶Lys-C、内肽酶Glu-C、胃蛋白酶和胰蛋白酶依次水解sapecin B，结果表明，sapecin B的半胱氨酸连接方式与卡律蝎毒素的连接方式完全一样，而与高等动物防卫素的不同，3个二硫键通过1-4，2-5和3-6连接而形成。

Fujiwara等（1990）采用内肽酶降解王浆素，再分别测定降解片段的氨基酸序列，确定了王浆素3个二硫键的连接方式，结果与sapecin B完全相同，随后他又用蛋白酶V8降解，进一步证实了以上结论。

## 2.2 防卫素的空间结构

绿蝇防卫素由40个氨基酸残基组成。三维结构研究表明，此防卫素的N-末端具有一个柔性环，中间的亲水亲油部分是1个α-螺旋，C-末端是两条反向平行的β-折叠链，反向平行的β-折叠的1个链通过2个二硫键与α-螺旋连接，而另1个链通过1个二硫键与N-末端的环相连（Bonmatin et al，1992；Corner et al，1995）。

蜜蜂的防卫素也具有与绿蝇防卫素相似的空间结构。不同的是，在2种蜜蜂防卫素的碳端，具有12个氨基酸的延长部分，这一部分也具有亲水亲油两性，从而使蜜蜂的防卫素的空间结构不同于其他昆虫。除了具有绿蝇防卫素的结构外，在C-末端还具有另1个α-螺旋。从蜂类中鉴定的3种防卫素，C-末端的延长部分非常保守，可能具有重要的生物学意义。

对所有种类的防卫素（17种）的分析表明，其氨基酸数目在N-端的柔性环结构中最不稳定；而昆虫的Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys结构和Cys-Xaa-Cys结构可维持中间的两亲性α-螺旋的稳定，这两个氨基酸序列在所有的防卫素中都是保守的。碧蝽防卫素的N-端柔性环与亲缘关系相近的红蝽相似，也与鞘翅目昆虫的相近，同源率分别达到72%和58%。由于半翅目昆虫是外生翅类中较为高等的种类，而鞘翅目昆虫是内生翅类昆虫中最原始的目，这种相同性似乎反应了防卫素的进化顺序。

## 2.3 防卫素的进化

已分离鉴定的17种防卫素中，以3种膜翅目昆虫的防卫素最长，达51个氨基酸残基，而以从麻蝇中分离的sapecin B最短，仅34个氨基酸，其他种类的氨基酸数目在38～43个残基之间。

Chernysh等（1996）采用Clustal方法，通过DNAstar程序分析，得到了包括蝎毒素在内的防卫素的系统树（图9-3）。

这一系统树与多数昆虫的系统发育是一致的。如同一目的昆虫一般相邻，形成了双翅

目、膜翅目、半翅目和鞘翅目防卫素簇，只有1种来源于麻蝇的sapecin B例外。与此同时，这一系统树与形态学系统树也有一些偏离，其中最显著的不同之处是半翅目的防卫素簇界于双翅目与膜翅目之间。即半翅目防卫素的进化超前于形态学的进化，这也说明了分子进化与形态进化不是平行发展的。

## 第三节 富脯氨酸肽族

Hara等（1995）将富脯氨酸肽族，分为蜜蜂抗菌肽（apidaecin）亚族和蜂蛾抗菌肽（abaecin）亚族。前者包括apidaecins、metalnikiwins、pyrrhocoricin和drosocin等种类的抗菌肽，后者包括abaecins、lebocins等。Hara等（1995）的分类依据是：①这两个亚族的肽链长短差别较大，apidaecin亚族属短肽类，有18～20个氨基酸；而abaecin亚族氨基酸数较多，最短的也有26个氨基酸，一般有32～34个氨基酸。②同一亚族的成员氨基酸的同源性很高，如abaecin与lebocin氨基酸同源率达41%，drosocin与apidaecin和pyrrhocoricin同源率分别达47%和53%（在适当位置引入空格使同源率达最高），而不同亚族的种类氨基酸同源率较低。③abaecin亚族成员的抑菌率甚至可被生理浓度的盐溶液所抑制，而apidaecin亚族的种类则无此现象。④两个亚族的抑菌原理也存在差异。apidaecin不影响细胞膜的穿透性，它的生物活性不被表面活性剂增强，其D-型对映体无抗菌活性，表明apidaecin的抗菌具有立体选择性步骤。相反，lebocin可能影响细胞膜的穿透性，其抗菌活性可被表面活性剂Triton-100增强。

### 1 蜜蜂抗菌肽亚族

#### 1.1 蜜蜂抗菌肽

蜜蜂抗菌肽（apidaecins）仅存在于膜翅目昆虫中。Casteels等（1994）为了比较不同种膜翅目昆虫的apidaecin的结构及进化，采用蜜蜂apidaecin Ⅰb的抗血清为抗体，建立了ELISA法以确定apidaecin存在，同时采用MALDI-TOF MS法分离出分子量大小为1 500～2 500u的肽类，筛选了膜翅目昆虫中的apidaecin。考虑到可能有的apidaecin对抗血清无阳性反应，或者分子量不在筛选范围，Casteels等还用大肠杆菌ATCC11 775、巨大芽孢杆菌QMB1551和*Arthrobact*er sp.NRRLB3724对选落组分进行生测。他们随后选择了2个亚目8个总科的12个代表种进行测定（表9-7）。测定种中只有7种具有apidaecins，而其他种虽然也具有抗菌活性（如蚁类），但主要抗菌组分不是apidaecins。

表9-7 筛选蜜蜂抗菌肽的昆虫

| 亚目 | 总科 | 科 | 种 名 |
|---|---|---|---|
| 广腰亚目 | 叶蜂总科 | 松叶蜂科 | 锯角叶蜂 *Neodiprion autumnalis* |
| 细腰亚目 | 姬蜂总科 | 姬蜂科 | 舞毒蛾黑瘤姬蜂 *Coccygomimus disparis* |
| | 小蜂总科 | 跳小蜂科 | 点缘蛾小蜂 *Copidosoma desantisi* |
| | | 小蜂科 | 大腿小蜂 *Brachymeria intermedia* |
| | 肿腿蜂总科 | 肿腿蜂科 | 肿腿蜂 *Goniozus legneri* |

（续）

| 亚目 | 总科 | 科 | 种 名 |
|---|---|---|---|
| | 蚁总科 | 蚁科 | 宾州黑木工蚁 *Camponotos pennsylvanicus* |
| | 胡蜂总科 | 胡蜂科 | 黄胡蜂 *Vespula maculifrons* |
| | | | 白斑脸黄胡蜂 *Vespula maculata* |
| | | | 德国黄胡蜂 *Paravespula germanica* |
| | 泥蜂总科 | 泥蜂科 | 蝉泥蜂 *Sphecius speciosus* |
| | 蜜蜂总科 | 蜜蜂科 | 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* |
| | | 熊蜂科 | 熊蜂 *Bombus terrestris* |

筛选结果表明，apidaecins 在广腰亚目昆虫中不存在，细腰亚目的小蜂总科、蚁总科和肿腿蜂总科中也不存在，胡蜂科中 *Vespula maculata* 与 *Paravespula germanica* 的 apidaecins 完全相同。此次筛选确定了 18 种 apidaecins 的化学结构，其中 13 种为新发现种类（表 9-8）。

**表 9-8 膜翅目昆虫中已发现蜜蜂抗菌肽的氨基酸序列**

| 昆虫种名 | 俗名 | 名称 | 氨基酸序列 |
|---|---|---|---|
| *Apis mellifera* | HBⅠa | Apidaecin Ⅰa | GN NRPVYIP QPRPPHPRI |
| | HBⅠb | Apidaecin Ⅰb | GN NRPVYIP QPRPPHPRL |
| | HBⅡ | Apidaecin Ⅱ | GN NRPIYIP QPRPPHPRL |
| | HBⅢ | Apidaecin Ⅲ | GN NRPIYIS QPRPPHPRL |
| *Bombus terrestris* | BbⅠ | Apidaecin Ⅰ | A NRPVYIP PPRPPHPRL |
| | BbⅡ | Apidaecin Ⅱ | NRPVYIP PPRPPHPRL |
| *Bombus pascuorum* | Bp | Apidaecin | G NRPVYIP PPRPPHPRL |
| *Sphecius speciosus* | CkⅠ | Apidaecin Ⅰ | NRPVYVP PPRPPHPRL |
| | CkⅡ | Apidaecin Ⅱ | NRPVYVP APRPPHPRL |
| *Vespula maculata* | BhⅠ | Apidaecin Ⅰ | G KP RPQQVP PRPPHPRL |
| | BhⅡ | Apidaecin Ⅱ | RPQQVP PRPPHPRL |
| *Vespula maculifrons* | YjⅠ | Apidaecin Ⅰ | SNKP RPQQVP PRPPHPRL |
| | YjⅡ | Apidaecin Ⅱ | NKP RPQQVP PRPPHPRL |
| *Coccygomimus disparis* | CdⅠ | Apidaecin Ⅰ | G KPNRPRPAPIQPRPPHPRL |
| | CdⅡ | Apidaecin Ⅱ | NRPRPAPIQPRPPHPRL |
| | CdⅢ | Apidaecin Ⅲ | G KPNKPRPAPIKPRPPHPRL |
| | CdⅣ | Apidaecin Ⅳ | NKPRPAPIKPRPPHPRL |
| | CdⅤ | Apidaecin Ⅴ | G KPSKPRPAPIKPRPPHPRL |
| | CdⅥ | Apidaecin Ⅵ | SKPRPAPIKPRPPHPRL |

Rees 等（1997）将大肠杆菌（*E. coli* NCO9001）注射入欧洲熊蜂（*Bombus pascuorum*）体液中，注射后 24h 在欧洲熊蜂血淋巴中诱导出很强的抗菌活性。进一步分离纯化和测序后得到 1 个新的蜜蜂抗菌肽，含有 17 个氨基酸残基，电喷射质谱测定其分子量为 1 962.3u，与理论分子量（1 962.1u）相符。至此，已发现的 apidaecins 已达 19 种。欧洲熊蜂的 apidaecin 与 *Bombus terrestris* 的 apidaecinⅠ结构非常相似，只有 1 处氨基酸发生了代换，熊蜂 *Bombus terrestris* 的 apidaecinⅠ的第 1 位为甘氨酸，而欧洲熊蜂的 apidaecin 相同位置为丙氨酸，两者同源率达 94%。

比较已发现的 19 种 apidaecins 可知，这些肽在几个位置是保守的，最主要的 1 处位于

C-末端，包括8个氨基酸的保守序列为PRPPHPRL；另1处是位于蜜蜂apidaecin第4和5位的R/K-P二肽，第4位上除了姬蜂为K外，其余均为R；第3处是位于蜜蜂apidaecin第9位的脯氨酸（除了蜜蜂中的apidaecinⅢ外）。这几处保守序列之间的间隔和离N-末端的距离均是可变的。表9-8中在适应位置引进了空格，以使氨基酸同源率达最大。亲缘关系越近的种类，变化越小，如2种熊蜂之间亲缘关系最近，apidaecin只变化了1个N-端的氨基酸，蜜蜂与熊蜂亲缘关系较近，除了肽链短了1个氨基酸外，只有2个氨基酸发生了变化。亲缘关系越远的种类，变化越大，如蜜蜂和姬蜂除了肽链长短变化较大外（18和20个氨基酸），至少有3处氨基酸发生了变化。

测定了除去蜜蜂apidaecinⅠA、Ⅱ和欧洲熊蜂apidaecin的所有其他种类的抗菌谱，结果表明：①蜜蜂apidaecinⅢ（9位由Ser取代Pro）对所有测定种类的微生物均无效，可见，第9位上的保守性氨基酸脯氨酸不能被取代，推而广之，Casteel等认为，所有保守序列的取代均会导致apidaecins的失活；②几种蜂类的apidaecins对大肠杆菌抗性变种11 775Apid有效，而其他（包括蜜蜂apidaecinⅠA）则无效，表明少数氨基酸的取代即能克服抗性；③不同的apidaecin的抗菌谱和活性专化性不同，而这些apidaecins之间的氨基酸变异却不大，表明只要对apidaecins稍加改变，便能得到抗菌谱和抗菌程度差异很大的不同品种，apidaecins应用于医学的潜力很大；④来源于姬蜂*C.diparis*的1组apidaecins，对肠杆菌科细菌活性较低，而对*C.jejuni*、*L.pneumophila*和*H.ducreyi*则较高；⑤所有apidaecins（包括蜜蜂的apidaecinⅢ）对植物相关菌（欧文氏菌属、*A.tumetaciens*、*R.meliloti*和假单胞杆菌*P.syringae*）均具有显著的抑制作用（表9-9）。

**表9-9 Apidaecins结构与抗菌活性的关系**

| 肽类俗名 | 氨基酸位置 3410 | Ec | Ea | Ps | St | Sy | Ye | Cj | Lp |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CdⅡ | SKK | * | * | * * | * * | — | — | * * * * | * * |
| CdⅣ | NKK | * * | * * * | * * * | * | * | — | * * * | * * |
| CdⅥ | NRQ | * * * | * * * * | * * * * | * * * | * * | * * | — | — |
| HBⅠb | NRQ | * * * | * * * * | * * * * | * * * | * * * | * * * | — | — |

表中 Ec：*E.coli* KS14；Ea：*Eruinia amylovora*；Ps：*Pseudomonas syringae*；St：*Salmonella typhimurium*；Sy：*Salmonella typhi*；Ye：*Yersinia enterocolitica*；Cj：*Camphlobacter je juni*；Lp：*Legionella pneumophila*

表9-9说明不同位置氨基酸的改变对活性的影响。由表中可知，当3位上的S被N所替代时（姬蜂apidaecinⅤ和Ⅵ第3位为S，其他种类的apidaecin第3位为N），对大多数测定菌的活性有所增加；当4位上和10位上的K被R和Q取代后（姬蜂apidaecinⅢ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ第4位和第10位具有K，前者在其他种类apidaecin中被R取代，后者则被Q、A或P取代），对大多数测定菌的活性有所增加，而对*Campylobacter jejuni*和*Legionell pneumophila*的活性则消失。以上结果表明，非保守位置的氨基酸代换影响apidaecins的抗菌谱。

## 1.2 蜜蜂抗菌肽类似物

蜜蜂抗菌肽类似物指从其他昆虫中分离的结构与其相似的天然抗菌肽。见于报道的主要有2种椿和果蝇，前者已提纯和鉴定出了结构，果蝇则先经cDNA测序后，再经化学方

法证实。这几种 apidaecin 类似物的氨基酸序列见表 9-10。

**表 9-10　半翅目与双翅目昆虫中蜜蜂抗菌肽类似物的氨基酸序列**

| 昆虫种名 | 肽类俗名 | 氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 红尾碧蝽（*Palomena prasina*） | Metalnikowin Ⅰ | VD KPD YRPRPRPPNM |
| | Metalnikowin ⅡA | VD KPD YRPRPWPRPN |
| | Metalnikowin ⅡB | VD KPD YRPRPWPRNMI |
| | Metalnikowin Ⅲ | VD KPD YRPRPWPRPNM |
| | | ┌GalNAc-Gal |
| 无翅膜红蝽（*Pyrrhocoris apterus*） | Pyrrhocoricin | VD KGS YLPRPTPP RPIYNRN |
| | | ┌GalNAc-Gal |
| 黄猩猩果蝇（*Drosogphila melanogaster*） | Drosocin | G KPRPYSPRPTSHPRPI RV |

## 1.2.1　果蝇抗菌肽

Bulet 等（1993）从黄猩猩果蝇体内分离到 1 种果蝇抗菌肽（drosocin），试验用带菌的昆虫针钉住 30000 只黄猩猩果蝇 3 龄幼虫，诱导果蝇抗菌肽的产生，24h 后用酸性提取液抽提处理。抽提液用革兰氏阴性菌大肠杆菌和革兰氏阳性菌藤黄细球菌进行生测，粗提取物经 Sep-Pak C18 柱分离，用 10% 乙腈酸水溶液洗提，得到 1 个对大肠杆菌具有强烈抑制活性的粗肽。此肽经 3 次反相高效液相色谱纯化后，通过 Edman 降解测序，得到了 1 个 19 肽。此肽的 11 位 Edman 反应为多义信号，纯化的肽在 75nmol 时可杀死大肠杆菌 D22，在 500nmol 时可杀死藤黄细球菌。

为了弄清 11 位上的氨基酸，Bulet 等（1993）根据新分离肽的 1～6 位氨基酸合成探针，来筛选经细菌诱导后的黄猩猩果蝇的 cDNA 文库，获得了 10 个阳性反应克隆。这 10 个阳性克隆均包括 1 段具有 65 个密码子的可读框。可读框由甲硫氨酸开始，由终止密码子结束。编码 64 个氨基酸残基，其中具有 19 个氨基酸的抗菌肽位于 22～40 位；抗菌肽的 N-端有 1 个含 19 个氨基酸的信号肽（1～19 位），由 2 个碱性氨基酸 Thr-Pro（20 和 21 位）与抗菌肽分开，这是一个潜在的内切酶位点；抗菌肽的 C-端有 1 个含 22 个残基的肽链（43～64 位），同样，两者之间以 2 个碱性氨基酸 Arg-Arg 分开（41 和 42 位），这又是一个酶切位点（图 9-8）。

```
TCCACCACTCCAAGCACA ATG AAG TTC ACC ATC GTT TTC CTG CTG CTT GCC TGC GTT 57
                   Met Lys Phe Thr Ile Val Phe Leu Leu Leu Ala Cys Val 13

TTT GCC ATG GCT GTG GCC ACT CCC GGC AAG CCA CGC CCC TAC AGC CCA CGC CCC 111
Phe Ala Met Ala Val Ala Thr Pro Gly Lys Pro Arg Pro Tyr Ser Pro Arg Pro 31

ACC TCC CAT CCT CGC CCC ATT CGA GTG AGG CGC GAG GCA CTG GCC ATC GAG GAT 165
Thr Ser His Pro Arg Pro Ile Arg Val Arg Arg Glu Ala Leu Ala Ile Glu Asp 49

CAC CTG GCT CAA GCT GCC ATC AGG CCA CCA CCC ATT CTG CCC GCC TAA AGATGTG 220
His Leu Ala Gln Ala Ala Ile Arg Pro Pro Pro Ile Leu Pro Ala ***         64

TGCATACCGCGGAGAAGTCATCCGATCAAATTTGTTTTGAAAAATCTTTATAAAAATTGTGAATTTTTTAC 291
TTTCTGCAAACAGTAAACAATAAACACACGAAAGACACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA          353
```

图 9-8　黄猩猩果蝇 drosocin 前体 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

（Bulet 等，1993）

测定的10个阳性克隆中，cDNA的碱基序列基本相同，尤其在编码抗菌肽的区域，几乎无任何变化。抗菌肽的11位在10个阳性克隆中，均为苏氨酸。由于在Edman降解测序时具有多义信号，估计11位的苏氨酸翻译后经过O-糖基化修饰。合成具有19个氨基酸的抗菌肽，合成的抗菌肽与来自果蝇的抗菌肽在经高效液相色谱洗提时差异较大，亲水性比自然抗菌肽小得多。分子量测定表明，自然肽为2 564.4u，合成肽为2 199.6u，两者相差364.8u。假设11位的苏氨酸被O-糖基化，自然肽经无水氟化氢处理后，得到分子量为2 199.6u和2 403.0u的2种分子。可见，11位苏氨酸上确实糖基化。其糖分子量为365u，又可分为203u和162u的2个糖。若考虑到糖基化时脱去1分子水，则实际分子量为221u和180u，这对应着N-乙酰半乳糖胺和半乳糖。自然肽溶于无水甲醇中，经盐酸处理后，其挥发物经气质联用仪测定，其分子量和保留时间均证明这两种糖为N-乙酰半乳糖胺和半乳糖，其连接方式应为半乳糖-N-乙酰半乳糖胺-苏氨酸。这是第一个经O-糖基化的抗菌肽实例。

更为重要的是，合成肽的抗菌活性只有自然肽的1/5～1/10，表明糖基化具有非常重要的生物学意义。进一步研究糖基化和膜上受体的相互作用，与细菌细胞膜上肽聚糖的联系，对蛋白酶降解的抑抗作用，对肽聚糖合成酶的竞争性抑制等方面，对深入了解糖基化的生物学意义无疑是十分重要的。

Bulet等（1993）用cDNA探针通过Northern杂交还证实，黄猩猩果蝇幼虫和成虫经细菌感染后，drosocin专一性mRNA含量急剧增加，表明了drosocin抗菌反应的灵敏性。

### 1.2.2 碧蝽梅氏抗菌肽

Chernysh等（1996）从经细菌诱导的红尾碧蝽的体内分离到4种富脯氨酸的抗菌肽。为了纪念昆虫免疫学的先驱Serguei Metalnikow，命名为梅氏抗菌肽（Metalnikowins）。根据分离顺序分别称为MetalnikowinⅠ、ⅡA、ⅡB和Ⅲ，其中Ⅰ、ⅡA含有15个氨基酸残基，ⅡB和Ⅲ含有16个氨基酸残基。质谱法测定Ⅰ、ⅡA、ⅡB和Ⅲ天然肽的分子量分别为1 838.1、1 893.1、2 040.4和2 024.3u。根据氨基酸残基计算的理论分子量分别为1 838.6、1 893.3、2 040.7和2 024.5u，两者符合得非常好，证明这4个肽未经过任何翻译后加工。

MetalnikowinⅠ、ⅡA、ⅡB和Ⅲ是1类差异很小的抗菌肽，它们的差异主要表现在C-末端。它们的亲水性相当强，有50%的氨基酸残基带有电荷或具有极性，在15或16个氨基酸残基中，只有2个或4个氨基酸是疏水性的。在带电荷的氨基酸中，4个是碱性的，2个是酸性的，离子化特性很强（pI=10.04）。

人工合成MetalnikowinⅠ，经Edman降解测序和质谱分析证实后，用两种标准抗菌物质MSI-94和PGLa作为正对照，测定了MetalnikowinⅠ对10种革兰氏阳性菌、7种革兰氏阴性菌的生物活性。令人惊讶的是，MetalnikowinⅠ对所有测定的细菌活性均较低，最小抑制浓度50～200μ mol，这是所有已经报道过的抗菌肽中活性最低的。但在碧蝽*Palomena prasina*中，4种Metalnikowins的总含量达200μ mol，足以引起抑菌作用。

最小抑制浓度以上的量（200μ mol）的MetalnikowinⅠ培养大肠杆菌后，间隔不同时间将大肠杆菌转移到新鲜培养基上，结果表明无论间隔时间多长，MetalnikowinⅠ处理过

的大肠杆菌均能恢复生长，表明 Metalnikowin Ⅰ 只是抑菌剂而不是杀菌剂

### 1.2.3 红蝽抗菌肽

无膜翅红蝽（*Pyrrhocoris apterus*）的红蝽抗菌肽（pyrrhocoricin），于 1994 年由 Cociancich 等从经受免疫攻击的成虫血清中分离。此肽具有 20 个氨基酸残基，富含脯氨酸，含量达 25%，11 位在 Edman 降解中给出多义信号。质谱分析结果表明，其分子量为 2 543.3u。若假设 11 位为苏氨酸，且像 drosocin 一样被 N-乙酰半乳糖胺 O-糖基化，则理论计算分子量为 2 543.3u，两者非常符合。自然肽溶于无水甲醇中，经盐酸处理后，其挥发物经气质联用仪测定，其分子量和保留时间均证明糖为 N-乙酰半乳糖胺。

此外，Cociancich 等在另 1 次试验中，也从红蝽中分离到 pyrrhocoricin。分子，测定结果表明，11 位的苏氨酸除了有 N-乙酰半乳糖胺外，也具有半乳糖，其连接方式应为半乳糖-N-乙酰半乳糖胺-苏氨酸，就像 drosocin 一样。

Pyrrhocoricin 的结构决定了它的许多物理化学性质。pyrrhocoricin 亲水性很强，除在 11 位具有极性的糖基外，有 50%的氨基酸带有电荷或者是极性的，只有 3 个氨基酸疏水，仅占 15%。在带电荷的氨基酸中，4 个为碱性氨基酸，1 个为酸性氨基酸（pI = 10.3）。pyrrhocoricin 和 drosocin 非常相似。它们的氨基酸同源率达到 55%，均为短肽（分别具有 20 个和 19 个残基），富脯氨酸（两者分别达 25%和 33%），阳离子特性（pI 为 10.3 和 12.1），相同位置（11 位）存在 O-糖基化取代基，与苏氨酸连接的糖均为 N-乙酰半乳糖胺。

测定了革兰氏阳性菌藤黄细球菌、巨大芽孢杆菌、*A. viridans*、金黄色酿脓葡萄球菌、腐物寄生性链球菌、枯草杆菌 OB935、乳酸小球菌、苏云金杆菌和绵羊李司忒氏菌；革兰氏阴性菌大肠杆菌 D22、1106、肠杆菌 *E. clacae* β12、绿脓杆菌 A.T.C.C.82118、鼠伤寒沙门氏菌、肺炎球菌、粘质沙雷氏菌 Db11、粪产碱杆菌（*A. faecalis*）、黄单胞杆菌 *X. campestris* pv *orizae* 和欧文氏菌 *E. carotovora carotovora* 对 pyrrhocoricin 的反应。结果表明 pyrrhocoricin 对革兰氏阳性菌巨大芽孢杆菌活性最高，最小抑制浓度达 1～2.5μmol，其次为藤黄细球菌，为 5～10μ mol，对其他革兰氏阳性菌均＞10μ mol 或无效；pyrrhocoricin 对革兰氏阴性菌中的大肠杆菌 D22 最高效，最小抑制浓度＜1μ mol，对大肠杆菌 1106，肠杆菌 *E. clacae*、β12，绿脓杆菌 A.T.C.C.82118 均为 5～10μ mol，对其他革兰氏阴性菌无效。

将大肠杆菌 D22 在 10μM 的 pyrrhocoricin 溶液中放置 1min 后取出，培养 24h 后，未发现大肠杆菌的恢复，表明 pyrrhocoricin 为杀菌剂而不是抑菌剂。

## 1.3 蜜蜂抗菌肽亚族的进化

蜜蜂抗菌肽（Apidaecin）最先从蜜蜂血液中分离。该亚族肽包括来源于膜翅目的 apidaecins，来源于半翅目红蝽的 pyrrhocoricin 和来源于蝽的 metalnikowins，来源于双翅目果蝇的 drosocin。氨基酸残基数 14～20，脯氨酸含量达 25%以上，所有成员均具正电，链中包含着精氨酸-脯氨酸双体或赖氨酸-脯氨酸双体，很多成员还包含有精氨酸-脯氨酸-精氨酸三联体（在 pyrrhococirin 中为 2 个，drosocin 中为 3 个，apidaedcins 中为 1 个）。

Apidaecin 亚族肽中存在 2 种类型。1 类是无取代基的，如来源于膜翅目的 apidaecins

和来源于蝽的 metalnikowins；另 1 类是 O-糖基化的，如 pyrrhocoricin 和 drosocin。有趣的是，来源于双翅目的富含甘氨酸的双翅肽，N-端的 18 个氨基酸残基与 apidaecin 亚族肽非常相似，也具有 O-糖基化取代基。这些抗菌肽的 O-糖基化取代基均位于苏氨酸上，这些糖基化的抗菌肽一旦糖基被移除，抗菌活性便大大下降，表明了糖基化的重要生物学活性。

图 9-9 是 Chernysh 等（1996）应用 Clustal 方法，通过 DNAstar 程序分析出的 apidaecin 亚族肽的系统树。膜翅目的 apidaecins 仅以蜜蜂的 3 种 apidaecins 为代表，由于果蝇和 *Phormia* 双翅肽的富含脯氨酸的 N-端与 apidaecins 同源率很高，故也将这 2 种肽放入了系统树中。

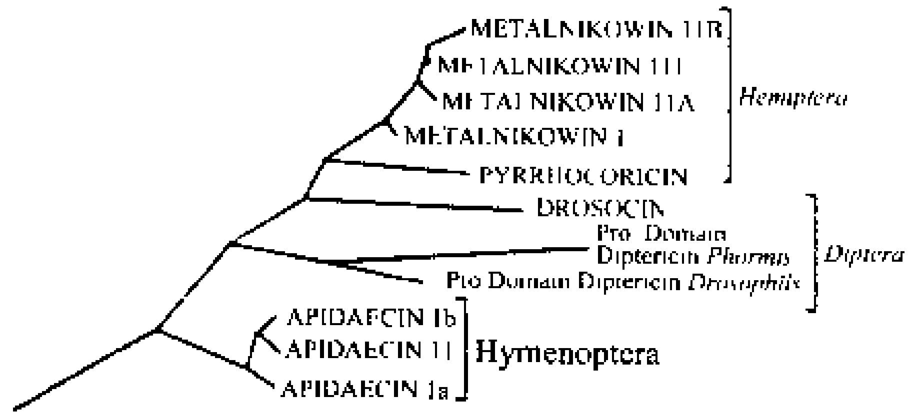



图 9-9　蜜蜂抗菌肽及类似肽的系统树
（仿 Chernysh 等，1996）

从系统图上看，metalnikowins 与同目的 pyrrhocoricin 最相近，其次是 drosocin，再次为来源于双翅目昆虫 *Phormia* 和果蝇的双翅肽，而与膜翅目昆虫的 apidaecin 相距最远。metalnikowins 不同于 pyrrhocoricin 和 drosocin 的显著区别在于前者未进行 O-糖基化，这显然是前者缺少苏氨酸的缘故。O-糖基移除大大降低了 pyrrhocoricin 和 drosocin 的抗菌活性，这与无 O-糖基的 matalnikowins 的活性是已知抗菌肽中最低的结果相一致。实际上，在红尾碧蝽的血淋巴中，metalnikowins 的含量比 pyrrhocoricin 和 drosocin 分别在红蝽和果蝇血淋巴中的含量高 2 个数量级，matalnikowins 是抑菌剂而 pyrrhocoricin 和 drosocin 是杀菌剂，显然后二者比前者经济、有效得多。

Apidaecin 抗菌肽族的进化与昆虫分类相关。如相同目的昆虫 apidaecins 之间变异较小，形成了以目为单位的 3 个 apidaecin 簇，即半翅目簇、双翅目簇和膜翅目簇。与此同时，这一系统树与昆虫形态系统树也存在着显著的区别。如半翅目昆虫的 apidaecins 位于膜翅目和双翅目的上端，即半翅目 apidaecins 的进化速度明显快于形态进化速度，这也说明了分子进化与形态进化不是平行发展的。

## 2　蜂蛾抗菌肽亚族

蜂蛾抗菌肽（Abaecin）亚族肽是另一类富含脯氨酸的抗菌肽。目前已鉴定出的种类集中于膜翅目、双翅目和鳞翅目昆虫中（表 9-11）。

表 9-11　蜂蛾抗菌肽亚族抗菌肽的氨基酸序列

| 昆虫种类 | 肽类 | 氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 熊蜂（*Bombus pascuorum*） | Abaecin | FVPY NPPRPGQS KPF PSFPGHG PFNPK IQWPYPLP-NPGH |
| 意大利蜜蜂（*Apis mellifera*） | Abaecin | YVPYPNVPQPG RRPF PTFPGQG PFNPK IKWPQG Y |
| 黄猩猩果蝇（*Drosophila melanogaster*） | Metchnikowin | HRRQG PIFDTRPSPFNPNQP RP GPIY |
| 家蚕（*Bombyx mori*） | Lebocin1 | Gal-GalNAcα┐<br>DLRFLY PRGKL PVP TPP PFNPKPIYIDMGNRY |

（续）

| 昆虫种类 | 肽类 | 氨基酸序列 |
| --- | --- | --- |
| | | GalNAcα┐ |
| | Lebocin2 | DLRFLY PRGKL PVP TPP PFNPKPIYIDMGNRY |
| | | GalNAcα┐ |
| | Lebocin3 | DLRFLY PRGKL PVP TLP PFNPKPIYIDMGNRY |

## 2.1 膜翅目昆虫蜂蛾抗菌肽

### 2.1.1 欧洲熊蜂

欧洲熊蜂经大肠杆菌诱导后，无细胞血液用反相高效液相色谱分离后，用33%乙腈洗提，得到对藤黄细球菌具有微弱的抑制活性（33%抑菌率），对大肠杆菌具有强烈的抑制作用（100%抑菌率）的抗菌肽。此肽采用Edman降解测序仅测到前面的34个氨基酸残基。将此肽用内切蛋白酶Lys-C从赖氨酸羧基端剪切后，形成3个肽段，分别用Edman降解分析，得到了此肽的全部序列。采用MALDI-TOF-MS分析证实此肽的C-末端未酰胺化。

### 2.1.2 蜜蜂

蜜蜂的abaecin可抑制革兰氏阴性和阳性菌。Casteels-Josson等（1994）应用PCR扩增技术，扩增了与蜜蜂abaecin相关的DNA片段。根据蜜蜂abaecin的氨基酸序列合成简并寡核苷酸，克隆出扩增片段后作为探针筛选源于遭受免疫攻击的蜜蜂血淋巴cDNA文库，此外，采用5’RACE测定转录产物5’-端的核苷酸序列，得到了蜜蜂abaecin的cDNA序列（图9-10）。

```
GGATCTGAGAGAAAGATCTGCACACTCGAGGTCTGTAGTATCTCGACAGTTGCATAAAACGGAAAAAAAG  70
AATACGAG ATG AAG GTA GTG ATA TTT ATC TTC GCA CTA CTC GCC ACG ATA TGC    123
         Met Lys Val Val Ile Phe Ile Phe Ala Leu Leu Ala Thr Ile Csy    15

GCA GCA TTC GCG TAT GTA CCA TTA CCA AAT GTA CCA CAA CCA GGA CGT CGT CCG 177
Ala Ala Phe Ala Tyr Val Pro leu pro Asn Val Phe Gln Pro Gly Arg Arg Pro 33

TTT CCA ACG TTT CCT GGT CAG GGA CCA TTC AAT CCG AAA ATT AAA TGG CCT CAA 231
Phe Pro Thr Phe Pro Gly Gln Gly Pro Phe Asn pro Lys Ile Lys Val Pro Gln 51

GGC TAT TAA TCGTCCAATGGACAAATCAATGGAATATACTTATACGGTTCACGTGATAAATCTACTG  298
Gly Tyr ***                                                             53

TGGTGAAACAATCGATAATTGATGGGGTATTATAATATAATTATGAATTGAAATAAATCGTATAAGTATT  368
TATCGAAGAAAAAAAAAAAAAAA                                                 390
```

图9-10 蜜蜂的蜂蛾抗菌肽cDNA及导出的原肽

（Casteels-Josson等，1994）

克隆出的cDNA大小为390碱基对。整个序列中只有1个ATG密码子，位于79～81核苷酸处。显然这就是起始密码子，终止密码子TAA位于238～240核苷酸处，可读框编

码 53 个氨基酸。用 von Heijne 标准分析氨基酸序列表明，这段肽的剪切位点只有 1 个，位于 19 位氨基酸处，从 20 位氨基酸到 53 位氨基酸共 34 个氨基酸为蜜蜂的 abaecin。此肽除了 19 个氨基酸的信号肽外，无前导序列，因而此肽称为原 abaecin。这意味着原 abaecin 一旦进入内质网，翻译后加工即已完成，成为了有生物活性的 abaecin。不同克隆的核苷酸序列略有差异，但只有第 52 密码子 GGC 的第 1 碱基被 A 替代后，造成了氨基酸的差异，由 Gly 变成了 Ser，若这一改变在蜜蜂中表达，则蜜蜂 abaecin 至少应具有 2 种。

Levashina 等（1995）认为蜜蜂的 abacin 代表这类大型富含脯氨酸的抗菌肽的原型。

## 2.2　黄猩猩果蝇的梅氏抗菌肽

黄猩猩果蝇的梅氏抗菌肽（metchnikowin）由 Levashina 等（1995）从经受免疫攻击的果蝇中分离。这是 1 个具有 26 个氨基酸残基的抗菌肽，与蜜蜂的 abaecin 同源率达 35%，对细菌和真菌均具有显著的抑制作用。

## 2.3　蚕幼抗菌肽

Hara 等（1995）从家蚕体内分离到 1 类蚕幼抗菌肽（lebocins）。用大肠杆菌（*E.coli* HB101）免疫家蚕 5 龄幼虫，采用反相高效液相色谱对血淋巴进行分离，得到 3 个抗菌峰。3 个峰经 SDS/PAGE 电泳后出现在分子量为 5 500u 的相同位置，表明这 3 个抗菌肽具有相似的分子结构。对这 3 个抗菌肽的氨基酸测序表明，峰 1 和峰 2 均具有 32 个氨基酸残基，除了 15 位在 Edman 测序时没有信号以外，其他氨基酸均相同。峰 3 也具有 32 个氨基酸残基，除 16 位的脯氨酸被亮氨酸取代外，峰 3 的其他氨基酸与峰 1 和峰 2 相同。通过氨基酸分析知这 3 个肽中均具有 1 个分子的苏氨酸，而 Edman 测出的已知序列无此氨基酸，故知这 3 个肽的 15 位均为被修饰了的苏氨酸。

Hara 等发现，这 3 个肽均可被弱氧化剂过碘酸盐所氧化，推测具有糖的存在。用离子喷射质谱对这 3 个肽的分子量进行了测定，它们的分子量均超出理论值。肽 1 的分子量超出 365.3u，1mol 的 N-乙酰氨基己糖（221.2u）和 1mol 的己糖（180.2u），通过 O-糖基化于苏氨酸上，同时脱去 2 个分子的水，刚好与实测分子量相当。肽 2 和肽 3 的分子量分别超出理论值 202.6u 和 202.9u，O-糖基化 1mol 的 N-乙酰氨酸己糖于苏氨酸上，同时脱去 1 个分子的水，与实测分子量相当。进一步分析表明肽 1 上具有 N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）和半乳糖（Gal），而肽 2 和肽 3 上具有 N-乙酰半乳糖胺。应用 α-N-乙酰半乳糖胺糖苷内酶酶解肽 1，结果表明 GalNAc 和 Gal 通过 β-1，3-糖苷键相连，再由 GalNAc 以 α 键与苏氨酸 1 位 C 原子相连，形成 Galβ1-3GalNAcα-1Thr 结构。肽 2 和肽 3 则以 α 键与苏氨酸相连。

这 3 个肽对革兰氏阴性菌 *Acinetobacter* sp. 和大肠杆菌均具有明显的抑制活性。其中肽 3 的活性最高，其次是肽 2。人工合成的全肽成分无抑菌活性，表明 O-糖基化对这 3 个肽的活性表达是必需的。由于肽 1 的抑菌活性明显低于肽 2，表明糖链的延长可明显降低抑菌活性。测定结果还表明，这 3 个肽可能影响细菌细胞膜的通透性。肽 1，2，3 被作者分别命名为 lebocin1，2，3。lebocin1 和 2 氨基酸序列完全相同，只是苏氨酸上的糖链长度不一，两者可能分别是糖链延长或截短加工时的产物和反应物。lebocin3 与其余 2 个肽

只有 16 位上 1 个氨基酸不同，这可能由编码这些肽的基因中 1 个碱基被取代造成。由此可以推知，在家蚕内，至少存在 2 个 lebocin 基因。

最近，lebocin1 和 2 的 cDNA 被 Chowdhury 等分离，证实了其 mRNA 可由细菌的侵入而诱导。

## 第四节　富甘氨酸肽族

富甘氨酸抗菌肽的变异性很大，分子量 $10-30\times10^3$u。主要成员有鳞翅目的天蚕抗菌肽（attacins）、双翅目的麻蝇抗菌肽（sarcotoxinⅡ）、双翅抗菌肽（diptericin）、鞘翅目的鞘翅抗菌肽（coleoptericin）和膜翅目昆虫的膜翅抗菌肽（hymenpterans）。多数种类抑制革兰氏阴性细菌。

### 1　天蚕蛾抗菌肽

天蚕蛾抗菌肽（Attatin）又称樗蚕素，由 Boman 等（1981）首先从惜古比天蚕蛾中发现。天蚕蛾受细菌攻击后，血淋巴中诱导了一系列蛋白族，其中电泳凝胶上的第 5 条谱带命名为 P5，即 attatin。但在当时，对 attatin 的异质性、抗菌活性等均未进行细致研究。Hultmark 等（1983）随后在抗菌测定时重新发现了这种分子量比天蚕素大得多的抗菌肽，进一步研究得知，对 P5 抗体起反应的 attatin 包括 6 个不同的组分，称为 attatin A 至 F。Hurlbert 等（1985）通过双向凝胶电泳又从舞毒蛾中分离了 5 种 attatin 类似物。

Hultmark 等（1983）对惜古比天蚕蛾中的 attatin 的研究表明，不同种的 attatin，其 N-端结构不同，可分为两类。其中 3 个组分的 N-端碱性，结构相同；2 个组分的 N-端酸性，氨基酸序列略有不同。这些结果表明 attatin 基因可能只有 2 种。Kockum 等（1984）通过克隆和测序 attatin 的 cDNA 证实了这一推论。这 2 种 cDNA 在编码区有 76% 碱基相同，而在终止信号之外同源率仅达 36%。与 cecropin 基因相似，如此高同源率的 2 种基因也许是基因复制的结果。

无疑，2 种基因产物经过翻译后加工衍生出 attatin 的 6 个不同的组分，Engstrom 等（1984）测定出含有 184 个氨基酸的 attatin F 。他们的研究结果表明，attatin F 可能是 attatin E经蛋白酶剪去 C-末端的 1 段氨基酸形成的。

cDNA 克隆和测序结果表明，编码 N-端酸性 attatin 的可读框编码出 188 个氨基酸残基，而这正是 attatin E，若剪去 C-末端的 4 个残基，Ser-Lys-Tyr- Phe，剪切后肽链与 attatin F 一致。同样，C-末端的这 4 个残基在 N-端碱性 attatin 的 cDNA 可读框中也存在于同样位置，若在 N-端碱性的 attatin 中也存在同样的剪切，则形成了对应于 attatin E 和 F 的另 2 种 N-端碱性的 attatin。

研究表明 attatins 翻译后以前原 attatin 的形式存在。此外，它们的 N- 端还需进一步加工，N-端碱性的 attatin 还需在 N-端形成焦谷氨酸，这一环化过程引起了谷氨酰胺正电荷的消失，环化过程与前面的 C-末端 4 个氨基酸残基的剪切过程，使 attatin 共形成了 6 种不同的组分。

Attatins 的抗菌谱十分狭窄，仅对大肠杆菌和来源于 *Anheraea* 幼虫肠道的另 2 种细

菌有明显的抑制作用。attatin 对大肠杆菌的作用部位是外膜。此外，在惜古比天蚕蛾中，attatin 还利用 cecropin 和溶菌酶的活性，这 3 种抗菌成分在惜古比天蚕蛾中协同作用，清除入侵的细菌。

除了惜古比天蚕蛾和舞毒蛾之外，attatin 类似物还在鳞翅目的另 1 种大型蛾柞蚕中发现。

## 2　双翅抗菌肽族

### 2.1　绿蝇的双翅抗菌肽

#### 2.1.1　化学结构

双翅抗菌肽（Diptericin）又称为双翅肽，由 Dimarcq 等（1988）从经细菌诱导的新陆原绿蝇（*Phormia terranovae*）幼虫的血淋巴中分离出来。此肽为 9000u 左右，具有 82 个氨基酸残基、抗革兰氏阴性菌。diptericin 的 N-末端为富脯氨酸段，17 个氨基酸中含有脯氨酸 6 个，脯氨酸含量达 35%，diptericin 的中段富含甘氨酸，对 dipterin 的 cDNA 序列分析表明，在最后 1 个氨基酸即苯丙氨酸之后，还有 1 个甘氨酸，推测此肽在翻译后加工中 C-末端酰胺化（图 9-11）。

```
         ┌GalNAc-Gal-G                                      ┌GalNAc-Gal-G
DEKPKLLLPT-PAPPNLPQLV-GGGGGNRKDG-FGVSVDAHQK-VWTSDNGRHS-IGVTPGYSQH
LGGPYGNSRP-DYRIGAGYSY-NF
```

图 9-11　绿蝇双翅抗菌肽的氨基酸序列
（Dimarcq 等，1988）

对绿蝇 diptericin 的 mRNA 分析表明，绿蝇 diptericin 以原肽形式翻译，在绿蝇 diptericin 上游还具有 1 个由 18 个疏水性氨基酸组成的信号肽（信号肽序列见果蝇 diptericin 部分）。

Bulet 等（1995）分离出绿蝇血淋巴中的 diptericin 肽片段后，采用生化、仪器分析和酶解反应等手段，得到了以下结果。

(1) 尽管对 cDNA 序列分析结果表明，此肽的 10 位、43 位和 54 位都具有苏氨酸。但 Edman 测序却在检测到 43 位的苏氨酸的同时，未能检测到 10 位和 54 位的苏氨酸。表明这两个位置的氨基酸在翻译后进行了加工。

(2) 质谱仪测定了从血淋巴中分离的 diptericin 的 5 个片段，其分子量都比理论分子量大，相差分子量是 203 或 162u 的倍数。考虑到翻译后修饰过程中脱水，实际应为 221 和 180u，而这恰是 N-乙酰半乳糖胺和己糖的分子量。表明 10 位和 54 位的苏氨酸翻译后加工可能是 O-糖基化。

(3) 由于无水氟化氢与糖蛋白作用时，特异性的剪切 O-糖基键，因而只脱去糖蛋白上的糖而不破坏肽链。作者用无水氟化氢处理 diptericin 的 γ 片段，其分子量从 9 423.3u 下降到 8692.6u，后者与理论分子量非常符合。进一步证实了 10 位和 54 位的翻译后加工为 O-糖基化。

（4）将 dipterricin 放于无水甲醇中再以盐酸处理，释放的挥发物经气质联用仪分析，证实糖基为 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖和葡萄糖。

（5）对含有 3、4 和 6 个糖成分的 diptericin 片段进一步分离纯化时，总是导致分子量的进一步缩小，而只含有 N-乙酰半乳糖胺的片段却不被分离纯化步骤分解。事实上，质谱分析表明，片段 δ 具有 2 分子的 N-乙酰半乳糖胺，分别连接于 10 位和 54 位的苏氨酸上，γ 片段的质谱分析结果为，54 位的苏氨酸上具有 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖，α 片段的质谱分析则表明，10 位上的苏氨酸上具有 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖和葡萄糖。由于只有 N-乙酰半乳糖胺单独与苏氨酸相连的片段，故 10 位和 54 位的苏氨酸均直接与 N-乙酰半乳糖相连。当苏氨酸位连接 2 分子糖基时，总是半乳糖和 N- 乙酰半乳糖胺，而无葡萄糖和 N-乙酰半乳糖胺，故糖链上半乳糖应为第 2 个糖。只有当检测到第 3 个糖时，葡萄糖才在质谱分析中出现，表明连接顺序为葡萄糖-半乳糖-N-乙酰半乳糖胺-苏氨酸。

（6）糖基的移除导致 diptericin 肽片段的失活，可见，糖基是 diptericin 发挥活性所必需的。一般情况下，糖基的作用有几个方面：如在糖蛋白中，糖基参与了细胞识别和信息传递；O-糖基化对于抵抗蛋白酶对肽链的水解也是非常重要的，若移除糖基，则很快被蛋白酶水解，故糖基的存在，起到保护肽链的作用。此外，糖基对于维持肽链特定的空间构型也具有十分重要的意义。

（7）研究结果证实，diptericin 具有酰胺化的 C-末端，这与 cDNA 序列分析预测的结果相一致。

可见，绿蝇 diptericin 的翻译后加工是已知抗菌肽中最为复杂的，不仅涉及到酶剪切和 C-末端酰胺化，而且包括 10 位和 54 位上苏氨酸的 O-糖基化。

### 2.1.2　合成部位

Dimarcq 等（1990）用 cNDA 原位杂交结果表明，绿蝇 diptericin 可由血细胞和脂肪体细胞合成。

## 2.2　果蝇的双翅抗菌肽

### 2.2.1　化学结构

Wicker 等（1990）诱导果蝇成虫产生抗菌血淋巴后，根据绿蝇 diptericin 第 38～43 位的氨基酸序列合成了寡脱氧核苷酸探针，与果蝇成虫中分离出的总 RNA 杂交，结果表明，免疫果蝇成虫中存在 1 条强信号谱带，而对照果蝇没有。这条谱带的大小为 0.7kb 左右。此外，在 2.5 和 9.5kb 处也具有微弱的杂交信号。

随后，Wicker 等建立了免疫果蝇 mRNA 的 cDNA 文库，用前述探针筛库，分离出 9 个阳性克隆，大小从 0.1 到 0.5kb，对包含最大插入片段的克隆进行分析表明，插入片段大小为 466 个核苷酸，从第 1 个三联体密码 ATG 起的最大可读框编码了 106 个氨基酸，以终止密码子 TAA 结束。比较这一氨基酸序列与绿蝇 diptericin 可知，两者非常相似，从而表明此处克隆的 cDNA 是编码果蝇 diptericin 的 cDNA 。由于 diptericin 在绿蝇和果蝇中先后发现，故前者应称为 diptericin A，而后者应称为 diptericin B。存在于 diptericin A 中

的5联体甘氨酸，在 dipterićin B 中的相似位置也存在（图 9-12）。

```
CGGCTTCAATTGAGAACAACTGAG ATG CAG TTC ACC ATT GCC GTC GCC TTA CTT TGC TGC 60
                         Met Gln Phe Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Cys Cys 12

GCA ATC GCT TCT ACT TTG GCT TAT CCG ATG CCC GAC GAC ATG ACC ATG AAG CCC 114
Ala Ile Ala Ser Thr Leu Ala Tyr Pro Met Pro Asp Asp Met Thr Met Lys Pro 30

ACT CCA CCA CCG CAG TAC CCA CTC AAT CTT CAG GGA GGC GGC GGT GGC CAG AGC 168
Thr Pro Pro Pro Gln Tyr Pro Leu Asn Leu Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gln Ser 48

GGC GAT GGT TTT GGC TTT GCA GTC CAG GGT CAC CAG AAG GTG TGG ACC AGC GAC 222
Gly Asp Gly Phe Gly Phe Ala Val Gln Gly His Gln Lys Val Try Thr Ser Asp 66

AAT GGA CGC CAC GAG ATT GGA CTG AAT GGA GGA TAT GGA CAG CAC TTG GGA GGA 276
Asn Gly Arg His Leu Ile Gly Leu Asn Gly Gly Tyr Gly Gln His Leu Gly Gly 84

CCA TAT GGC AAC TCA GAA CCG AGC TGG AAA GTG GGA AGC ACC TAC ACC TAC AGA 330
Pro Tyr Gly Asn Ser Glu Pro Ser Try Lys Val Gly Ser Thr Tyr Thr Tyr Arg 102

TTT CCG AAT TTC TAA GCTTCATAAATATTTTATTGTAAAAAACTTCACCAAATATTATCTCGATTG 396
Phe Pro Asn Phe ***                                                      106
GTATCCGAGTCTAGCTATTATAAAAACCATACCCACTTTGTATATTCAGATAATTGCAAAATATATAACC 466
```

图 9-12 果蝇双翅抗菌肽的 cDNA 序列及导出的原肽序列

（Wicker 等，1990）

```
                                          ↓
Dros. diptericin    MQ FTIAVALLCCAIASTL  A YPMP
Phorm. diptericin   MKLFY    LLVICALS L  A V MA
Sarcotoxin Ⅱ        MKSFVFFAACMAIIALSSLVQA YP
```

图 9-13 3 种富甘氨酸族抗菌肽的信号肽序列

比较以上推导序列与 dipterićin A 和 sarcotoxinⅡ的结果可知，dipterićin B 可能具有1个含有19个疏水性氨基酸残基的信号肽，若从此处剪切（图 9-13 ↓ 所示处），dipterićin B 信号肽与 dipterićin A 的同源率达37%，与 SarcotoxinⅡ信号肽的同源率达32%。剪切后 dipterićin B 还具有1小段（4个）疏水性氨基酸 YPMP。虽然从推导氨基酸序列很难准确定位信号肽的剪切位置，直到成熟的 dipterićin B 分离出来才能最终确定。但根据 dipterićin A 的结构推导，此肽最终从第23位剪切，成熟 dipterićin 以 Asn 开头，如果这一假设正确，则 dipterićin B 具有83个氨基酸残基，计算分子量为 8 993u，这与 dipterićin A 非常相似，后者含有82个残基，分子量为 8 611u。

Dipterićin B 的 C-末端紧接终止信号 TAA，之后具有121个非编码核苷酸序列。此序列中没有 poly（A）附加信号共有段 AATAAA。

推导出的 dipterićin B 与 dipterićin A 非常相似，除了氨基酸数目和分子量大小相似外，这2个肽均含有大量甘氨酸（分别为18%和22%）和脯氨酸（分别为11% 和10%），在有些区段氨基酸同源率非常高，达60%左右。dipterićin 分子可分为2个区域，即 P 区域和 G 区域。dipterićin B 的 P 区域具有15个氨基酸残基，其中5个脯氨酸，含量达33%；dipterićin A 的 P 区域具有17个氨基酸，其中有6个脯氨酸，含量达35%。此外，双翅目的另一富甘氨酸抗菌肽 SarcotoxinⅡ的 P 区域也具有7个脯氨酸，脯氨酸含量达50%。G 区域含有大

```
Dros. diptericin   1 DD  MTMKPTPPPQYPL  15
Phorm. diptericin  1 DEKPKLILPTPAPPNLP 17
Sarcotoxin Ⅱ       1 Q  KLPVPIPPPTNPP    14
```

图 9-14 3 种富甘氨酸族抗菌肽的 P 区域

量甘氨酸，近 P 区域处有 1 个甘氨酸 5 联体（图 9-14）。

从 G 区域结构看，diptericin A 和 B 与另两类富甘氨酸族抗菌肽 attatin 和 sarcotoxin Ⅱ 有密切联系。attatin 和 sarcotoxin Ⅱ 均具有两个 G 区域，分别称为 G1 和 G2 区域，它们与 diptericin A 和 B 的 G 区域有很好的对应关系。根据图中的对应排列氨基酸同源率从 11%（sarcotoxin Ⅱ G1 区域与 diptericin B G 区域 ）到 34%（sarcotoxin Ⅱ G2 区域与 diptericin A G 区域），一般同源率达 20% 以上（图 9-15）。

```
1 DRLGASISRDVNFGVS DTLTKSVSANLFRNDN  HNLDASV F  R SDVRQNNGFNFQKTGGMLDYS  HA
2 NGHGLSLTDTHIPGFG DKMTAAGKVNVFHNDN  HDITAKA FATR NMPDIANVPNFNTVGGGIDYM FK
3 NLQGGGGG QSGDGFG   FAVQGHQKVWTSDNGRHEIGLNGGYGQHLGGPYGNSEPSWK VGSTYTYR F PNK
4 QLQGGGGG NRKDGFG   VSVDAHQKVWTSDNGRHSIGVTPGYSQHLGGPYGNSRPDYR IGAGYSYN F G
5 NGHGLNAGLTRFSGIG NQATVGGYSTLFRSNDGLTSLKANAGGSQWLSGPFANQR DYS FGLGLSHNAWRG
6 DKIGASASAAHTDFINRNDYSLDGKLNLFKTPD  TSIDFNAGFKKF DTPFMKSSWEPN FGFSLSKY F
```

图 9-15　4 种富甘氨酸肽 G 区域的氨基酸序列

图 9-15 中 1 为 Sarcotoxin Ⅱ G1，第 137～200 位；2 为 Attatin G1，第 57～122 位；3 为 Dros. diptericin，第 16～83 位；4 为 Phorm. diptericin，第 18～83 位；5 为 Sarcotoxin Ⅱ G2，第 201～270 位；6 为 Attatin G2，第 123～188 位。

通过与 diptericin A 比较，假定导出肽 23 位上的 Asp 为 diptericin B 的 1 位氨基酸，根据 von Heijne 的准则，其上游第 4 和第 5 位的 Ala-Tyr 之间极可能是剪切位点，如此，成熟的 diptericin B 就由二肽酶每次移除 X-Pro 二个氨基酸逐步形成，这与 cecropin A 和 B 的原肽和其他小分子多肽一样。若昆虫中具有 X-Pro 或 X-Ala 二肽酶，则原肽的加工常由这些酶进行。sarcotoxin ⅡA 的修剪也具有相同的过程。

### 2.2.2 cDNA 的表达

用 diptericin B 的 cDNA 作为探针，测定了 mRNA 在正常和受细菌攻击后的雄性果蝇成虫体内的含量。结果表明，当果蝇接菌 2h 后，便可观察到明显的表达，接菌 4h 后表达量最高，之后逐步下降。同法测定了不同时期的表达，除蛹早期外，接菌的各虫期 diptericin B 基因均可表达。此外，在未经处理的蛹早期和成虫体内，diptericin B 基因也有一定量的表达。但在幼虫期和胚胎期，未测到 diptericin B 基因的表达。

## 2.3 麻蝇抗菌肽

### 2.3.1 化学结构

双翅目的另一富甘氨酸抗菌肽为麻蝇抗菌肽（SarcotoxinⅡ），这是 1 类一级结构相似的类群，已经鉴定出的包括 3 种，分别称为ⅡA、ⅡB 和ⅡC（图 9-16）。其中ⅡA 的 P 区域具有 7 个脯氨酸，脯氨酸含量达 50%。从 G 区域结构看，sarcotoxin Ⅱ与 diptericin A 和 B 及 attatin 有密切联系。sarcotoxin Ⅱ具有两个 G 区域，分别称为 G1 和 G2 区域，这 2 个区域与 attatin 的区域相似，它们与 diptericin A 和 B 的 G 区域有很好的对应关系。

Kanai 等（1990）分析 sarcotoxin Ⅱ基因簇时克隆出了 3 个 sarcotoxin Ⅱ基因，分别称为 Unit 1、2 和 3。它们的信号肽序列均具有 25 个氨基酸残基，与 sarcotoxin Ⅱ 相比，Unit 1缺失长达 29 个氨基酸（83～102 位）1 段肽，而其他 2 个肽即 Unit 2 和 3 均与 sar-

```
QKLPVPIPPP-TNPPVAAFHN-SVATNSKGGQ-DVSVKLAATN-LGNKHVQPIA-EVFAEGNTKG-
GNVLRGATVG-VQGHGLGASV-TKSQDGIAEN-FRKQAEANLR-LGDSANLIGK-VSQTDTKIKG-
IDFKPQLSSS-SLALQGDRLG-ASISRDVNFG-VSDTLTKSVS-ANLFRNDNHN-LDASVFRSDV-
RQNNGFNFQK-TGGMLDYSHA-NGHGLNAGLT-RFSGIGNQAT-VGGYSTLFRS-NDGLTSLKAN-
AGGSQWLSGP-FANQRDYSFG-LGLSHNAWRG
          Sarcotoxin IIA

QKLPVPIPPP-SNPPVAVLQN-SVATNSKGGQ-DVSVKLSATN-LGNNHVQPIA-EVFAEGNTKG-
GNVLRGATVG-VQGHGLGASV-TKT                                QTDTKIKG-
LDFQPQLSSS-TLALQGDRLG-ASISRDVNFG-VSDTLTKSVS-ANLFRNDNHN-LDASVFRSDV-
RQNNGFNFQK-TGGMLDYSHA-NGHGLNAGLT-RFSGIGNQAT-VGGYSTLFRS-NDGLTSLKAN-
AGGSQWLSGP-FANQRDYSFG-LGLSHNAWRG
          Unit 1

QKLPVPIPPP-TNPPVAAFHN-SVATNSKGGQ-DVSVKLAATN-LGNKHVQPIA-EVFAKGNTQG-
GNVLRGATVG-VQGHGLGASV-TKTQDGIAES-FRKQAEANLR-LGDSASLIGK-VSQTDTKIKG-
IDFKPQLSSS-SLALQGDRLG-ASISRDVNRG-VSDTLTKSIS-ANLFRNDNHN-LDASVFRSDV-
RQNNGFNFQK-TGGMLDYSHA-NGHGLNAGLT-RFSGIGNQAN-VGGYSTLFRS-NDGLTSLKAN-
AGGSQWLSGP-FANQRDYSFG-LGLSHNAWRG
          Unit 2

QKLPVPIPPP-TNPPVAAFHN-SVATNSKGGQ-DVSVKLAATN-LGNKHVQPIA-EVFAEGNTKG-
GNVLRGATVG-VQGHGLGASV-TKSGNGIAES-FRKQAEANLR-LGDSASLIGK-VSQTDTKIKG-
IDFKPQLSSS-SLALQGDRLG-ASISRDVNRG-VSDTLTKSIS-ANVFRNDNHN-LDASVFRSDV-
RQNNGFNFQK-TGGMLDYSHA-NGHGLNAGLT-RFSGIGNQAN-VGGYSTLFRS-NDGLTSLKAN-
AGGSQWLSGP-FANQRDYSFG-LGLSHNAWRG
          Unit 3
```

图 9-16 麻蝇抗菌肽（sarcotoxin ⅡA）及其类似物的氨基酸序列
（Kanai 等，1990）

cotoxin Ⅱ相同，均具有 270 个氨基酸残基，而且同源性非常高。如 sarcotoxin ⅡA 分别与 Unit 2 和 Unit 3 编码的功能肽只有 4 个氨基酸不同，同源率达 98.5%；与 Unit 1 只有 21 个氨基酸不同，同源率达 92.2%。显然它们均是 sarcotoxin Ⅱ族成员。

这几种基因产物与 sarcotoxin ⅡA 相比，其结构非常相似。它们均以谷氨酰胺开头，由于 sarcotoxin ⅡA 的 N-端焦性化，推测这 3 个 sarcotoxin Ⅱ族成员的 N-端也为焦谷氨酸。此外，这 4 个成员均已甘氨酸结尾，是否成熟肽以倒数第二个氨基酸结尾，而甘氨酸被脱去时将其酰胺化，形成保护性的 C-末端，仍需进一步研究。

### 2.3.2 作用机制

Sarcotoxin ⅡA 被免疫攻击诱导，由麻蝇的脂肪体合成，最后分泌至血淋巴中，发挥抑菌作用。观察表明，sarcotoxin ⅡA 引起细菌菌体形状的改变，当生长期的大肠杆菌经 sarcotoxin ⅡA 处理后，菌体极度延长，出现球状粘性外扩颗粒和显著的突出，这表明 sarcotoxin ⅡA 的主要作用可能是限制大肠杆菌细胞壁的合成，包括隔膜形成也受到抑制，从而使大肠杆菌分裂受阻，菌体变形。

## 3 鞘翅抗菌肽

Bulet 等（1991）分离到 1 种鞘翅抗菌肽（coleoptericin）。将加热杀死的细菌注射至鞘翅目昆虫 *Zophobas atratus* 的 3 龄幼虫体内，间隔一定时间后收集血淋巴用革兰氏阳性菌

*M. luteus* 检测抗菌活性。结果表明，诱导后 12h 能测到显著的抗菌活性，这一抗菌活性可保持到 72h，之后开始下降。但较为缓慢，直至 4 星期后，抗菌活性仍显著高于对照。采用革兰氏阴性菌大肠杆菌 D22 和 D31 检测，得到同样的结果。当用蛋白酶处理血清后再检测，抗菌活性消失，表明抗菌成分为肽类。

进一步分离纯化经免疫攻击的血清，得到 3 个抗菌成分，成分 A 经 Edman 降解测序后，得到 N-端的 60 个残基，其 38 位存在谷氨酸。用谷氨酸 C-端内切蛋白酶对成分 A 进一步降解，经反相高效液相色谱分离后得到 2 个组分，其中之一具有 38 个残基，与已测序的 60 个残基的前端部分完全对应。第二个组分经 Edman 降解测序后，得到成分 A 的C-端的 36 个氨基酸残基，质谱测定成分 A 的分子量为 8 114.7u，根据测定残基计算出的分子量为 8 110.8u，两者非常符合，从而证明成分 A 是一个具有 74 个氨基酸残基的多肽，此肽富含甘氨酸（18%）。甘氨酸均匀的分布于整条肽链上（图 9-17）。

SLQGGAPNFP-QPSQQNGGWQ-VSPDLGRDDK-GNTRGQIEIQ-NKGKDHDFNA-GWGKVIRGPN
KAKPTWHVGG-TYRR

图 9-17　鞘翅抗菌肽的氨基酸序列

（Bulet 等，1991）

N-端（前 23 个氨基酸）缺少带电荷的氨基酸，中部则具有大量带正或负电荷的氨基酸，C-端则具有显著的碱性。总的 pI 值为 10.9，肽链中不具有半胱氨酸残基。这一富含甘氨酸的抗菌肽被称为 coleoptericin。

采用平板生长抑制生测法测定了 coleoptericin 对 11 种 13 个株系的革兰氏阴性菌和 12 种革兰氏阳性菌的抑制活性。在革兰氏阴性菌中，coleoptericin 对大肠杆菌 D22 和 D31 最具活性，其次为 *A. baumanii* 和 *P. maltophilia*，对其他菌种和株系无效；在革兰氏阳性菌中，coleoptericin 对藤黄细球菌（*M. leteus*）有活性，对其他菌种无活性。

## 4　膜翅抗菌肽

### 4.1　化学结构

Casteels 等（1993）分离、纯化并鉴定了来自经免疫攻击的蜜蜂血淋巴的膜翅抗菌肽（hymenoplaecin），这是一个具有 93 个氨基酸残基的多肽，N-端的谷氨酸环化成 2-吡咯烷酮-5-羧酸，测定分子量为 10 270u，计算分子量为 10 270.4u，两者非常符合。

比较麻蝇的 diptericin A 与 hymenoptaecin 的 G 区域表明，两者同源率仅为 23%，保守性氨基酸同源率仅为 10%，若以整段肽计算，同源率更低，且其中一半为甘氨酸。若比较各个氨基酸在整条肽中的比例，这 2 个肽的相似之处更为明显。它们都是富甘氨酸肽类，甘氨酸含量两者分别占 19% 和 18%。但在 hymenoptaecin 中，不存在像 diptericin A 那样的 P 区域，在前 45 个氨基酸中，脯氨酸只有 1 个。这 2 个肽都是亲水性肽，hymenoptaecin亲水性很强，只在 N-端的 5～10 位有较短的疏水区，而 diptericin A 亲水性稍逊，具有 3 个较短的疏水区。Hymenoptaecin 具有 26 个带电氨基酸残基（$\Delta = 5^+$），而 diptericin A 具有 16 个带电氨基酸残基（$\Delta = 4^+$）。

Casteels-Josson 等（1994）应用 PCR 扩增技术，扩增了与蜜蜂 hymenoptaecin 相关的

DNA 片段。根据蜜蜂 hymenoptaecin 的氨基酸序列合成简并寡核苷酸，克隆出扩增片段后作为探针筛选源于遭受免疫攻击的蜜蜂血淋巴 cDNA 文库，此外，采用 5' RACE 测定转录产物 5'-端的核苷酸序列，得到了蜜蜂 hymenoptaecin 的 cDNA 序列（图 9-18）。

起始密码子 ATG 位于 82～84 位核苷酸处，终止密码子位于 509～511 位核苷酸处，可读框编码 129 个氨基酸残基。用 von Hei jne 标准分析氨基酸序列表明，这段肽的剪切位点只有 1 个，位于 17 位氨基酸处，前面的 17 个氨基酸为信号肽，接着的 19 个氨基酸残基为前导序列，hymenoptaecin 长度为 93 个氨基酸残基。

```
ACARAGAAATCGATCAGCTCTACAGACAAGAGCATTACAAATCTTGTGCTTAAGAGTT   CGAAAAAAA      67
                                                         GAA         T
T AAACAATTTCCAAG ATG AAA TTC ATC GTG TTG GTT CTC TTC TGT GCC GTT GCA TAC 124
AA          A  C       T         T                                     T
                 Met Lys Phe Ile Val Leu Val Leu Phe Cys Ala Val Ala Tyr 14
                     Asn         Leu
GTT TCT GCT CAA GCG GAA TTG GAA CCT GAG GAT ACA ATG GAT TAT ATC CCG ACT  178
Val Ser Ala Gln Ala Glu Leu Glu Pro Glu Asp Thr Met Asp Tyr Ile Pro Thr  32

CGT TTC CGA CGA CAA GAA AGA GGA TCC ATT GTC ATT CAA GGA ACT AAA GAG GGA  232
Arg Phe Arg Arg Gln Glu Arg Gly Ser Ile Val Ile Gln Gly Thr Lys Glu Gly  50

AAA AGT CGT CCA TCC TTG GAC ATT GAT TAC AAA CAA CGT GTC TAC GAT AAG AAT  286
Lys Ser Arg Pro Ser Leu Asp Ile Asp Tyr Lys Gln Arg Val Tyr Asp Lys Asn  68

GGA ATG ACA GGA GAC GCC TAT GGT GGA CTA AAC ATT CGT CCT GGA CAA CCT AGT  340
 T                    T                                     T
Gly Met Thr Gly Asp Ala Tyr Gly Gly Leu Asn Ile Arg Pro Gly Gln Pro Ser  86
                                                            Ser
CGA CAG CAT GCA GGA TTC GAG TTT GGG AAA GAA TAT AAG AAT GGT TTC ATC AAA  394
      A
Arg Gln His Ala Gly Phe Glu Phe Gly Lys Glu Tyr Lys Asn Gly Phe Ile Lys  104

GGA CAA AGT GAA GTT CAA CGT GGT CCT GGT GGC AGG CTT TCA CCA TAC TTT GGA  448
Gly Gln Ser Glu Val Gln Arg Gly Pro Gly Gly Arg Leu Ser Pro Tyr Phe Gly  122

ATA AAT GGT GGA TTT AGA TTT TGA GATATTTTCAAATAACAATTAAATTAGCCATTTACATA  510
Ile Asn Gly Gly Phe Arg Phe ***                                          129

GCATTTAATAATTATTTATTCCAGTAATGCATTTATTTCATTTTGATCTTATTAATTTATAAAAATTTGG  580
CATTGAAAGAAAATTGATAGATTGTAATTCAATTGTATTAATTACAATATAAGAGATTCGAATAAATATA  650
ATTTTATCATTATAAAAAAAA                                                    671
```

图 9-18 蜜蜂膜翅抗菌肽的 cDNA 及导出的前原肽序列

（Castcels-Josson 等，1994）

Hymenotaecin 的 cDNA 不同克隆之间略有变异。在信号肽序列中，发现有 2 个氨基酸有变化，2 位的赖氨酸被天冬氨酸取代，5 位的缬氨酸被亮氨酸取代。这 2 处取代可同时存在于 1 个克隆中。在 28 号克隆中，85 位的脯氨酸被丝氨酸取代。前几处取代不造成成熟 hymenoptaecin 的多样性，但后 1 处取代引起了 hymenoptaecin 的差异，表明在蜜蜂中，至少存在 2 种不同的 hymenoptaecins。

## 4.2 抗菌谱

Casteels 等（1993）应用凝胶抑菌圈法测定了 hymenoptaecin 对大约 100 个菌种和菌株

的活性。结果表明，hymenoptaecin 对革兰氏阴性菌和阳性菌均有活性。对几种阴性菌（博代氏杆菌属、嗜血杆菌属、克雷白氏杆菌属和 *Yersinia*）抑制作用很强，对大肠杆菌 K514 也十分有效。

在液体培养基中测定了 hymenoptaecin 的抑菌活性。结果表明，hymenoptaecin 的最小抑制浓度在 0.5～5μmol 之间，大于 apidaecin 对同样菌种的活性 有些菌种，如 *Xanthomonas campestris*，不能被 apidaecin 所抑制，但对 hymenoptaecin 非常敏感。此外，hymenoptaecin 对大肠杆菌 K514 的活性与培养基无关。无论是营养汤、酪蛋白酶解大豆汤还是 Luria 汤，也不管是溶解在 PBS 缓冲液中还是在 0.2mol 蔗糖液中，hymenoptaecin 均表现出相同的最小抑制浓度。这与 diptaecin 和 abaecin 不相同，diptaecin 在 PBS 缓冲液中活性降低了 90%，abaecin 则完全失活。

## 4.3 增效作用

表面活性剂 Tween 20 在浓度仅为 0.0005% 时，对 hymenoptaecin 显示出很强的增效作用，使 hymenoptaecin 的抑菌活性扩大了 10～20 倍，当 Tween 20 浓度增加时，增效作用并未增强。其他抗菌肽如 apidaecin 和 magainin 均未显著提高 hymenoptaecin 的抑菌活性，溶菌酶也对 hymenoptaecin 不增效，由于表面活性剂的增效作用，推测 hymenoptaecin 的作用靶标应在膜上（表 9-12）。

**表 9-12 其他抗菌物质对膜翅抗菌肽的增效作用**

| 抗菌物质 | 使用浓度 | 膜翅抗菌肽的最小抑制浓度（μmol）（大肠杆菌 K514） |
|---|---|---|
| 空白对照 | | 0.5～1 |
| Apidaecin ⅠA | 10μg/ml | 0.1～0.5 |
| Magainin B | 1μg /ml | 0.5～1 |
| Lysozyme | 100μg /ml | 0.1～0.5 |
| Tween 20 | 0.0005% | 0.01～0.05 |
| Tween 20 | 0.1% | 0.01～0.05 |

## 4.4 穿膜能力

由于异丙基硫代β-D-半乳糖苷的加入并不影响大肠杆菌细胞的生长，但能诱导菌体内β-半乳糖苷酶的产生。在培养基中加入显色剂邻硝基苯-β-D-半乳吡喃糖苷，此底物与β-半乳糖苷酶反应后显色，这一显色反应可通过显微镜观察 因此，这一方法可用来鉴别细菌细胞膜是否渗露。

用上述培养基培养的大肠杆菌在 hymenoptaecin 加入后，大约 2min 间隔便可观察到显色反应，若 hymenoptaecin 与 Tween 20 一起加入，并不能缩短加入到显色的间隔时间，但可显著增加显色程度。这表明 hymenoptaecin 和大多数抗菌肽一样，也是通过破坏细菌细胞膜而杀菌。

## 4.5 膜翅抗菌肽类似物

Rees 等（1997）将大肠杆菌（*E. coli* NCO9001）注射进入欧洲熊蜂（*Bombus pa*·

*scuorum*)体液中，注射后 24 h在欧洲熊蜂血淋巴中诱导出很强的抗菌活性。经 80% 乙腈淋洗，反相高效液相色谱分离后，得到 1 个抗菌肽。此肽仅对大肠杆菌具有抑制作用（抑菌率 89%），经进一步分离纯化后，纯组分在Edman测序时不起反应，表明 N-末端封闭，经电喷射质谱分析（ES-MS），F1-80%分子量为 10 122.06 u，这些结果表明 F1-80%与从蜜蜂血淋巴中分离出的hymenoptaecin相似，只是后者能有效抑制革兰氏阴性和阳性菌，而 F1-80%只能抑制革兰氏阴性菌。

## 5 半翅抗菌肽

半翅抗菌肽（hemiptericin）是 Cociancich 等（1994）从经受免疫攻击的无膜翅红蝽血清中分离到的 1 种富甘氨酸肽。此肽具有 133 个氨基酸残基，甘氨酸含量达 15%，质谱分析表明其分子量大小为 14 743.8u，与理论计算分子量 14 744.9u 相当。表明确定的氨基酸序列与天然肽相同，天然肽无任何翻译后修饰（图 9-19）。

```
DVELKGKGGE-NEGFVGLKAQ-RNLYEDDRTS-LSGTVKGQSQ-WKDPYPAQHA-GMARLDGTRT
LIENDRTKVT-GSGFAQREVA-TGMRPHDSFG-VGVEATHNIY-KGKNGEVDVF-GGVQRQWNIP
DRHQARGGIR-WRF
```

图 9-19 半翅抗菌肽氨基酸序列

（Cociancich 等，1994）

Hemiptericin 最显著的特征是带有大量电荷，有 1/3 的氨基酸残基带有电荷，其中带正电荷的残基为 24 个，带负电荷的残基为 20 个。由于带正电荷和负电荷的残基数相当，因此在 pH7.0 时，总电荷仅为 +3.6（pI9.4）。同时，这些带电氨基酸均匀分布于整个肽链上。计算机辅助分析未得出 hemipterricin 的任何空间结构。

# 第五节 抗菌肽的基因

昆虫抗菌肽引起的免疫与高等动物的免疫完全不同。鉴定出抗菌肽的基因，对于了解抗菌肽的诱发机制、调控手段及翻译后加工过程均具有十分重要的意义。因此，对抗菌肽基因的研究几乎与抗菌肽的研究同时起步，而且进展非常迅速，本节简述研究结果。

## 1 天蚕素及其类似物的基因

### 1.1 天蚕素基因

Xanthopoulos 等（1988）首先从遭受免疫攻击的惜古比天蚕蛾中分离鉴定了天蚕素 B 的基因。该基因长约 1kb，其中编码区长 0.9kb，包括 2 个外显子和 1 个约占 1 半长度的内含子（514bp）。它编码 62 个氨基酸的前原天蚕素 B。基因的全部编码区及侧翼区的序列均已测定。Gudmundsson 等（1991）进一步的研究结果表明，天蚕素 B 基因在单倍体中是单拷贝的。

Gudmundsson 等（1991）分离鉴定出了惜古比天蚕蛾的另 2 个天蚕素基因，即编码 cecropin A 和 D 的基因。他们分别采用前原天蚕素 A 和 D 的 cDNA 作为探针，对 λEMBL3

基因文库进行筛选，得到了 26 个阳性克隆。对这 26 个阳性克隆的分析结果表明，它们可以分为 2 类：1 类包含 22 个阳性克隆（λC1），它们对天蚕素 A 和 D 的 cDNA 探针均有阳性反应；另 1 类具有 4 个阳性克隆（λC2），它们只对天蚕素 D 的 cDNA 探针有阳性反应。应用 5'-和 3'-端专一性 cDNA 探针进一步筛选 λ C1，结果表明 λ C1 包含 cecropin A 的全基因和 cecropin D 第 2 外显子，表明 cecropin A 和 D 是紧密连接的。同样方法筛选 λC2，其中只有 cecropin D 基因而无 cecropin A 的基因序列（图 9-20，21）。

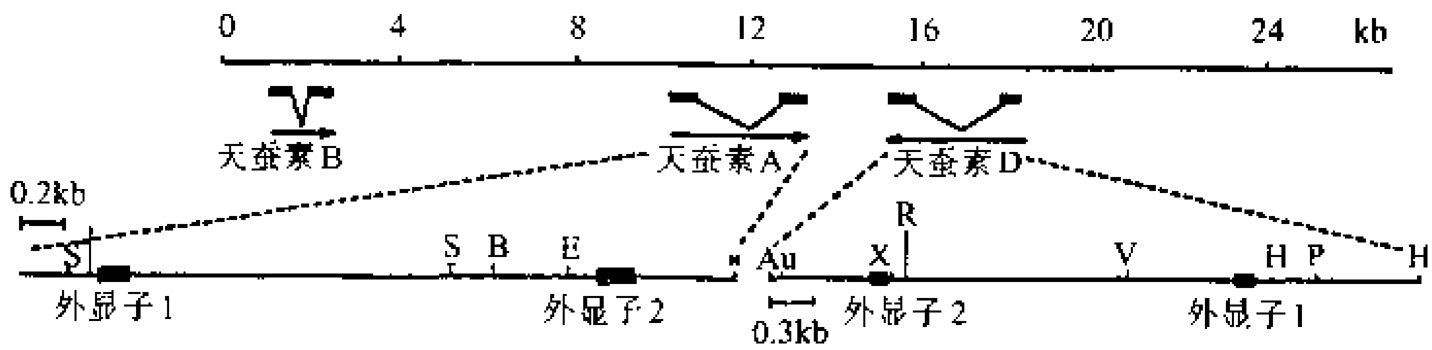



图 9-20　惜古比天蚕蛾中天蚕素基因座的组成及 A 与 D 的基因结构
（Gudmundsson，1991；Xanthopoulos，1988）

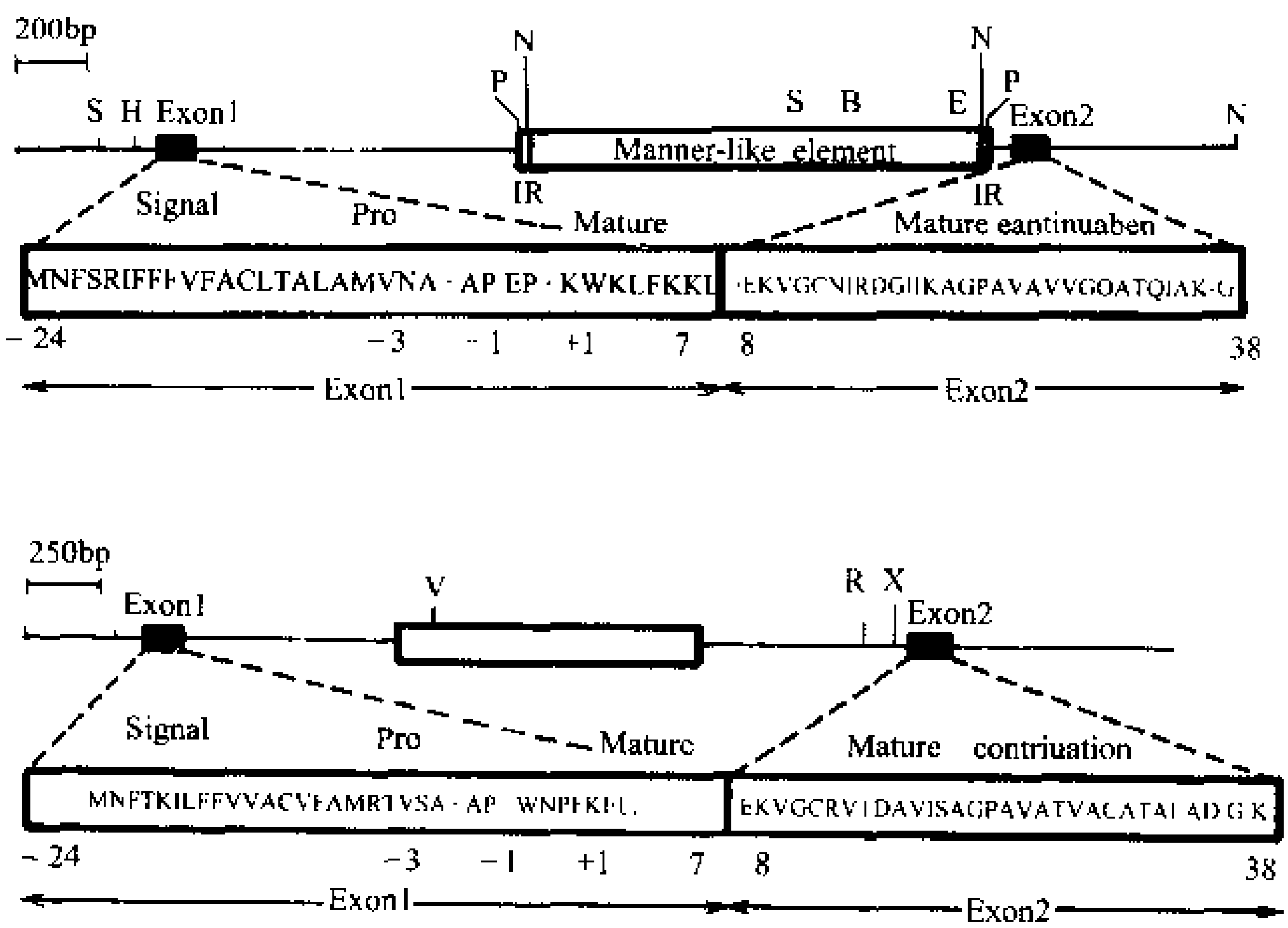



图 9-21　惜古比天蚕蛾中前原天蚕素 A（上）与 D（下）基因结构
（Gudmundsson 等，1991）

具有 cecropin A 和 D 的核苷酸链与 cecropin B 的基因相连的证据由 Xanthopoulos 等（1988）发现，在他们分离的 4 个具有 cecropin B 的阳性克隆中，其中 1 个（λCP908）可与 cecropin A 的 cDNA 杂交。限制性酶切图谱分析表明 λCP908 中包含有 cecropin A 的外显子 1，其序列与 λC1 中的对应序列完全相同。这些结果表明 cecropins 的 3 个基因处于长为 20kb 的同一基因座，其中 A 与 B 同向排列，而 D 反向排列。

Cecropin A 和 D 的基因大小分别为 3 241bp 和 3 820bp，上游非编码区均含有 TATA

框和昆虫基因特有的帽子结构，下游非编码区则具有 AATAAA 共有序列。cecropin A 和 D 基因编码区分别为 2.6 和 2.8kb。当比较染色体基因和 cDNA 序列时发现，cecropin A 基因有 1 个碱基不同，但这不造成编码氨基酸的差异。而 cecropin D 基因则有 6 个碱基不同，其中信号肽处的两处差异引起了氨基酸的代换。每个基因中均含有 1 个很大的内含子，其中 cecropin A 基因的内含子大小为 2 117bp，cecropin D 基因的内含子达 2 451bp，中间插有大小为 970bp 的逆转录子。

Southern 杂交分析结果表明，cecropin A 和 B 在单倍体中均为单拷贝的，而 cecropin D 可能是单拷贝或双拷贝的。限制性酶切片段的多样性可能是不同个体等位基因的变异造成的。

在惜古比天蚕蛾中，除天蚕素 D 基因外，所有已测定序列的免疫基因都有 1 个与 NF-κB 结合部位相似的序列。NF-kB 结合部位最先在哺乳动物基因组中鉴定，哺乳动物的 NF-κB 对免疫球蛋白 k 轻链基因在成熟 B 淋巴细胞中的表达起增强作用。后来发现它存在于许多不同类型的细胞中，对免疫、发炎和急性期反应中涉及的许多基因有调节作用。在惜古比天蚕蛾中，在免疫基因被诱导时激活 1 个 DNA-结合蛋白复合物，定名为惜古比免疫应答因子（CIF）。CIF 特异性地识别并结合在免疫基因启动子区中与 NF-kB 结合部位相似的序列。CIF 的 DNA 结合特异性、诱导曲线、电泳迁移率等特性均与哺乳动物的 NF-kB 相似（Sun et al，1992）。

### 1.2 麻蝇防卫素基因

Matsuyama 等（1988）分离棕尾别麻蝇体内的总 DNA，用限制性内切酶 Hind Ⅲ和 Pst Ⅰ剪切后电泳，转移并封闭至硝酸纤维素膜内，再用来自 pKM101 切口平移片段 Sau3AI-Sau3AI 包含编码 sapecin A 的所有核苷酸的探针杂交，在多位点均显示出阳性谱带。由于探针 DNA 无限制性内切酶 HindⅢ和 Pst Ⅰ的酶切位点，故不可能出现探针的裂碎。这一结果说明，sapecin A 的基因要么相当大，被限制性内切酶 HindⅢ和 Pst Ⅰ切成碎片，或者在麻蝇 *Sarcophaga peregrina* 染色体上存在多个 sapecin A 相关基因。因此，尽管 sapecin A 较小，但其前体蛋白的基因组成还是相当复杂的。

Kanai 等（1989）进一步分离 sapecin 基因时发现，翻译 sapecin 抗菌肽的基因簇串联在染色体上，由几个基因组成，具有大小为 95bp 的内含子。

### 1.3 果蝇天蚕素基因

Kylston 等（1990）鉴定出了果蝇的天蚕素基因座，其基因座位于 99E。该基因座异常紧凑，在不到 4kb 的 DNA 之内有 3 个表达的基因（A1，A2 和 B）及 2 个不表达的假基因，在不到 4kb 距离以外还有另 1 个相似的区。这些基因非常小，转录物仅 350bp，每个基因有 1 个长度仅 58-61bp 的内含子。这样密集的结构与惜古比天蚕蛾的天蚕素基因恰好相反。基因 A1 和 A2 编码的产物与麻蝇中相当于天蚕素的麻蝇素Ⅰ的序列相似。基因 B 有 5 处不同。3 个基因的诱导是一致的，但基因 B 表达的水平较低。虽然是协同诱导的，但 3 个基因的侧翼区并不可能作为调节单元的保守序列。因此，这 3 个基因可能各自有独立的调节单元，或者是有 1 个共同的单元统一调节整个基因座。后 1 种调节方式可能对密

集的基因更为方便。

### 1.4 天蚕素基因的进化

通过对天蚕素类基因的分析表明，在双翅目和鳞翅目昆虫中，天蚕素基因来自共同的祖先。在惜古比天蚕蛾中，围绕天蚕素B和D的变异比天蚕素A的变异大得多，天蚕素A和B的相似处比天蚕素D大得多，而且天蚕素A和B总是平行表达。这些结果表明天蚕素A和B的基因分化比天蚕素D从A/B基因分化要晚得多。同时，在果蝇和麻蝇中，天蚕素A和B与蛾类的天蚕素A和B较为相似，而差异较大的天蚕素D在蝇类中似乎不存在，表明天蚕素D在鳞翅目与双翅目分离后才在蛾类中单独进化。这也说明了天蚕素D分化的年代比A和B晚得多。

## 2 环状抗菌肽基因

用蜜蜂防卫素的特异性探针进行Northern杂交，分析mRNA的表达，结果表明蜜蜂防卫素基因为单拷贝，长度为640bp。

## 3 富脯氨酸族抗菌肽基因

用abaecin特异性探针进行Northern杂交，结果表明abaecin有2个拷贝，长度分别为900和540bp。由于已分离的abaecin的cDNA大小仅为389bp，与后1个拷贝大小相当，因此可能还具有abaecin类似物基因未分离鉴定出。

## 4 富甘氨酸族抗菌肽基因

### 4.1 天蚕抗菌肽基因簇

Kockum等（1984）克隆和测定了天蚕抗菌肽（attatin）的cDNA，结果表明惜古比天蚕蛾attatin具有2种cDNA。这2种cDNA在编码区有76%碱基相同，而在终止信号之外同源率仅达36%。与cecropin基因相似，如此高同源率的2种基因也许是基因复制的结果。在此基础上，Sun等（1991）测定出了樗蚕素的基因。基因座包括1个酸性和1个碱性樗蚕素的基因和2个假基因。2个有功能的樗蚕素基因反向转录，有2个内含子插在相似的位置上。2个基因上游有相同的GGGGATTCCT序列，这10个核苷酸的序列与哺乳动物的转录因子NF-κB结合部位的共有序列相似。

### 4.2 麻蝇抗菌肽基因簇

Kanai等（1990）克隆了麻蝇抗菌肽（sarcotoxin Ⅱ）的3个基因，分别称为Unit 1、2和3。这3个基因包含于3个转录单元中，每个转录单元大约1kb大小，编码区内均具有1个含76bp的内含子。此内含子在3个转录单元中处于相同位置，均位于第97个密码子之间，将密码子GGT或GTT分为GG、T或GT、T两个部分，内含子根据移除时的剪切序列以5’-GT-AG-3’与2个外显子分开。这三个基因的内含子同源率很高，Unit 1与Unit2之间只有2个碱基不同，同源率达97.4%，Unit1与Unit3之间也只有5个碱基

不同，同源率达到93.4%（图9-22）。

```
Unit 1 GTAAGTTGAAAACAAAAGATAGGAAGAAATGAGAAAATATTTGAAAATGATTTTGTTTTCTTACTTTTCGTTTTAG
Unit 2 GTAAGTTGAAAACAAAAGATAAGAAGAAATGAGAAAATATTTGAAAATGATTTTGTTTTCTTATTTTTCGTTTTAG
Unit 3 GTAAGTTGAAAATAAAAGATAAGAAGAAATTAGAAAATATTTGAAAATGATTTTGTTTTCTTATTTTTTGTTTTAG
```

图9-22 Sarcotoxin Ⅱ相关基因簇内含子比较

（Kanai 等，1990）

这3个转录单元之间以大约2kb的序列彼此分开，表明Sarcotoxin Ⅱ基因簇可能在染色体上串联排列，间隔为2kb。

克隆出的3个sarcotoxin Ⅱ基因的信号肽序列均具有25个氨基酸残基，除了Unit 1缺失含有29个氨基酸（83～102位）的1段肽外，其他2个肽即Unit 2和3均具有270个氨基酸残基，而且同源性非常高（图9-23）。

```
sarcotoxin ⅡA  MKSFVFFAACMAIIALSSLVQAYP
Unit 1         MKSFVLFAACMAIIALGSLAHAYP
Unit 2         MKSFVFFAACFAIVALNSLAHAYP
Unit 3         MKSFVLFAACMAIVALNNLAHAYP
```

图9-23 几种原sarcotoxin Ⅱ相关肽信号肽的氨基酸序列

（Kanai 等，1990）

更为有趣的是，这些转录单元的信号肽与sarcotoxin ⅡA的信号肽相比，也具有很高的氨基酸同源率。sarcotoxin ⅡA与Unit 1和Unit 3信号肽均只有4个氨基酸不同，同源率达83.3%；与Unit 2也只有5个氨基酸不同，同源率达79.2%。无论是信号肽还是功能肽，均具有如此高的同源率。这表明这些基因均是由原始祖先基因多次在染色体上复制而成的。

Unit 1、2和3基因在起始密码子上游均具有TATAAA和ATCAGTT核苷酸序列，前一序列即所谓TATA框，后1序列是昆虫基因特有的共有序列，这是分布于5'-端的帽子位点。sarcotoxin ⅡA的cDNA的起始位置也是ATCAGTT，表明5'-端的帽子位点至少在这1簇基因中是广泛存在的。

Unit 1、2和3基因在3'-端的非转录区，均具有poly（A）附加信号AATAAA，其中Unit 1，2和3分别具有1，3和2个附加信号序列。这表明转录后可能形成不同长度的同种mRNA的产物。

采用RNase作图法分析这些基因的表达，结果表明在正常幼虫中，这些基因均不表达。但当幼虫的表皮被伤害后，mRNA数量逐步上升，至伤害后3h达到高峰，然后很快降解。这表明Unit 1，2和3均是可表达的功能基因。至此可知，sarcotoxin Ⅱ抗菌肽至少包含4个基因。由于对染色体组基因的Southern杂交还显示1个尚未鉴定出的阳性谱带，表明sarcotoxin Ⅱ基因组可能还有其他相似基因的存在。

由于这3个基因是在幼虫伤害后同步表达，因此在各自的5'-端的非编码区一定存在着1个相同的对伤害刺激产生反应的区域。将这3个基因5'-端的核苷酸侧翼区输入计算机分析，以引进空格获取最大同源。结果表明这些基因虽然来源于共同的祖辈基因，但5'-端的非编码区的变异比编码区要大得多，存在着许多缺失段和插入段。尽管如此，从36到59位具有1段高度保守的序列。虽然至今仍不知道这1序列的具体功能，但它无疑是sarcotoxin Ⅱ基因表达的控制区域（图9-24）。

```
               -180                -170      -160             -150
Unit 1  GCAGACTTTAAT TAAAATTT        TGTTTTTATGCT TTTAAAGA     AAATACCCTG
Unit 2  G AAATTGTATTATAAAAATTAAACAAATATTTCTAGTCTATTAAAAGACACTCAATTA    C
Unit 3  GCAGACTTTAAT TAAAAATT        TGTTTTTATGCT TTTGAAGACGCTTACTTACGCTG
        * * * * ** * ***** **        * *** **  ** **  ****    *  **    *
     -140      -130      -120      -110      -100       -90       -80
        CAGAAGTAAATCACCTTTTATGATAATAATAATCTATGTTGTTGGGTAATTCCCTGATAATTTA
        TAG  GTTCTTCCCC          ATCAACAT GTGCAAG     GAAATACTGC
        TAGAAGTAAATCCCCTTTTATGATAATAAT TTCTTTGTTGTTGGGTTATTCC
         **  **   ** **         ** *  **  *    *      *    * * *
            -70       -60       -50       -40       -30       -20
        AATTGAAAGAGAAGCGTAACTGATAACAACAAGATCTCAATTGAGTATAAAAGCTTATGCGGTA
                      AACAACTGATAACAACAAAATCTCAATTGAGTATAAAAGTCACTGCAACA
                      AGTAACTGATAACAACAAAATCTCAATGGAGTATAAAAGTCACTGCAACA
                         *************** ******** ***********    **    *
        -10         +1            高度保守系列          TATA 框
        CCAATAAGCAGCATCAGTT
        GAGATAATCAACATCAGTT
        GAGATAATCAACATCAGTT
           **    * ********
                   帽子
```

图 9-24 sarcotoxin Ⅱ基因簇成员 5'-端核苷酸序列

（编号以 Unit 1 核苷酸为标准，＊号表示此位碱基同源）

（Kanai 等，1990）

## 4.3 双翅抗菌肽基因

Wicker 等（1990）用限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 剪切经处理的果蝇染色体 DNA，电泳后用 diptericin B 的 cDNA 杂交，结果在电泳图谱上只具有 1 条谱带，表明 diptericin B 的基因为单拷贝。同样的 cDNA 与果蝇幼虫唾腺多线染色体杂交后，在第二染色体右臂的 56 A 处可见单个杂交信号。

## 4.4 膜翅抗菌肽基因

用 hymenoptaecin 的特异性探针进行 Northern 杂交，分析 mRNA 的表达，结果表明 hymenoptaecin 为单拷贝，长度为 900bp。

# 第十章 昆虫的卵黄蛋白

动物为胚胎提供必要的营养有两种基本方式：输送式（cartering）和盒饭式（box-lunch）。前者为胎生动物所采用，母体通过血液不断为胚胎提供营养直至胚胎发育结束；后者由母体1次性将养料包装在卵内，按程序释出养料满足胚胎发育的需要。采用后者的是卵生的无脊椎动物和脊椎动物，约占整个动物种类的70%（Postlethwait & Giogi，1985）。如此众多的动物采用盒饭式供给方式，已越来越多地受到研究者的重视。昆虫卵属典型的盒饭式，含有大量蛋白质。它们大多由卵巢以外的组织合成，发育中的卵母细胞有程序地进行选择性摄取。卵黄蛋白的合成、摄取和利用已成为昆虫生理学与发育生理学的重要研究内容，用来阐述蛋白合成的基因表达和蛋白质的摄取以及降解机制。近年来又从昆虫中先后测定与纯化出多种卵黄蛋白受体和卵内蛋白酶，它们在卵黄摄入和利用过程中承担了十分重要的作用。本章全面介绍卵黄蛋白、卵黄蛋白受体和卵黄蛋白酶以及卵黄蛋白的合成、贮存、摄入和降解作用。

## 第一节 结构与性质

昆虫卵内蛋白质一般在脂肪体内合成，释入血淋巴的称为卵黄原蛋白（vitellogenin，Vg），在卵母细胞内则称为卵黄蛋白（vitellin，Vn或Vt），最初是由Telfer在1954发现的。他在研究惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）时，鉴定了1种雌性特异蛋白（female specific protein，FSP），1969年由Pan等命名为卵黄原蛋白。Vg在绝大多数的昆虫中具有相似的分子量、氨基酸组成及免疫特性，它由脂肪体合成后分泌到血淋巴中，被卵母细胞选择性摄取后成为Vn。Vn可能由糖基和脂基进行了修饰，因

此 Vn 和 Vg 在脂类和碳水化合物组成上有微细的差别。Bounes 等 1979 发现高等双翅目昆虫的卵黄蛋白与其他昆虫的 Vg 有许多不同之处。因此又将它们命名为“yolk protein”通常简写成“YP”。

在卵生脊椎动物中，雌性从肝脏中分泌 Vg，并对雌性激素的刺激作出反应。昆虫的雄虫一般不能合成 Vg。但 Mundall 等（1979），Kambysellis（1977），Dhadialla and Wyatt（1981），Chalaye（1979）已分别在昆虫 4 个目的雄虫中诱导产生了 Vg。Yamashita 和 Irie（1980）发现家蚕（*Bombyx mori*）的卵和胚胎能在雄性环境中存活和发育，甚至可以孵化，而不需要雌性特异性蛋白 Vg。这一发现说明其他来源的特异性蛋白和非雌性特异性蛋白也能起到卵黄蛋白质的作用，也就是说在昆虫的卵黄中，除雌性特异性蛋白外，还有其他的蛋白质在胚胎发育中也起着很重要的作用。此外，担负脂类运送的载脂蛋白，在卵黄中虽然量很少，但也十分重要。

卵黄蛋白以均一的颗粒分布在昆虫的中卵黄区，卵的外周分布较少。在卵细胞分裂时，中心卵黄区不参与分裂，被胚盘的上皮所包围。因而，卵黄与由它供给营养的组织之间有所分隔。胚胎发育时，卵内蛋白酶开始活化，水解贮存蛋白，为胚胎提供发育所需的氨基酸、脂类、维生素和矿物质。昆虫胚胎从卵黄蛋白中得到这些营养，但不像脊椎动物需要大量的钙离子和磷酸根离子。昆虫的卵黄蛋白总结起来有以下几方面功能：①为胚胎发育提供营养；②卵黄蛋白中的载脂蛋白（非雌性特异性蛋白）在血淋巴运输碳水化合物、胆甾醇和甘油二酯时作为载体；③卵黄也是核糖体和核糖核蛋白的贮存库。

## 1 结构

早期报道认为，昆虫的卵黄蛋白有 $100\times10^3$u 和 $50\times10^3$u 两个亚单位。后来证实这些亚单位是 $200\sim260\times10^3$u 大分子的水解蛋白片段（Koeppe 等，1976）。Bownes（1979）、Barnett 等（1980）研究发现，黄猩猩果蝇（*Drosophila melanogaster*）的卵黄蛋白有 $YP_1$、$YP_2$ 与 $YP_3$ 三种组分，由 3 个连锁基因控制，每个密码组可控制 1 个约 $50\times10^3$u 的肽链。蝇类不同于一般昆虫，它的 Vg 与哺乳动物的三酰基甘油脂酶的氨基酸序列相似。因此高等双翅目昆虫的卵黄蛋白属特殊的类群，称为 YP 而不称 Vg 是有其道理的。

以家蚕为例，卵内蛋白质包括卵黄磷蛋白（即 vitellin，在卵内呈晶体状），卵特异蛋白（egg specific proteins，ESP）和其他蛋白（如 $30\times10^3$u）蛋白 3 类。它们分别占卵蛋白的 40%、25% 和 35%。此外，还有一部分为载脂蛋白（lipophorin，LP）。

### 1.1 卵黄原蛋白的氨基酸序列

20 世纪 90 年代，昆虫和其他动物的 Vg 的氨基酸序列研究有了很大的发展。棉铃象甲（Trewitt 等，1992）、埃及伊蚊（Chen 等，1994）、家蚕（Yano 等，1994）、舞毒蛾（Hiremath Lewtoma，1997）、玫瑰锯蜂（*Athalia rosae*）（Nose 等，1997）和日本姬蜂（*Pimpha nipponica*）（Nose 等，1997）等多种昆虫的 Vg 基本结构的氨基酸序列都有了详细的报道（图 10-1）。

Sappington 和 Raikhel（1998）将 6 种昆虫，卵黄蛋白进行了比较，并考察它们之间的同源性发现，除胡蜂以外，昆虫 Vg 的结构是酶切而成的 2 个亚单位，酶切位点是（R/

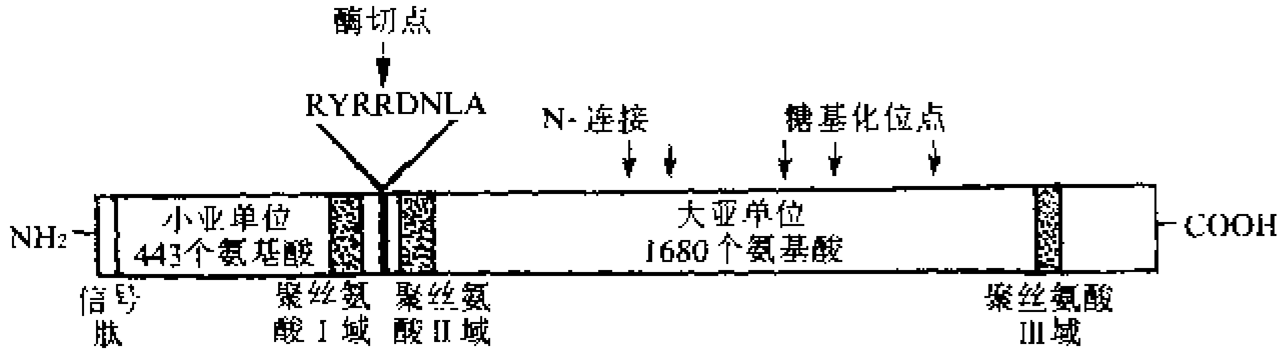



图 10-1 昆虫卵黄原蛋白的结构示意图

X）X（R/K）R 或 RXXR，带有 1 个相邻的 β-折叠，是由类枯草杆菌素（subtilisin）原蛋白转化酶进行鉴定的。在 4 种 Vg 中，酶切点在 Vg 前体 N-末端附近，另 1 种舞毒蛾则在 C-末端附近，从多重 Vg 序列比较中还可以发现，酶切点的变化不是由于外显子的位移，而是通过氨基酸序列的位点修饰发生的。胡蜂的 Vg 前体并不酶切，在它的祖先酶切位点上，RXRR 序列已经变成 LYRR，从而不再为转化酶所识别。

## 1.2 聚丝氨酸区

大多数脊椎动物和昆虫的 Vg 原始结构中，有 1～3 个丝氨酸残基的长链区。在 6 种测序的 Vg 中，有 3 种含丝氨酸区。家蚕和锯蜂中各含 2 个，伊蚊含有 3 个，姬蜂中只有 1 个富丝氨酸区（相当于伊蚊、家蚕和锯蜂的第二丝氨酸区），但不是长链。在脊椎动物的 Vg 中也包涵 1 个聚丝氨酸或高磷蛋白区，从它的编码在前体中的位置来看，似乎与昆虫的丝氨酸区无同源性。丝氨酸区的产生，是通过丝氨酸编码的扩增形成的，因此它的进化速率快于其他基因。

聚丝氨酸区的作用还不十分清楚，可能是作为激酶的底物存在的。脊椎动物的卵黄高磷蛋白是高度磷酸化的，磷酸丝氨酸的大量存在、会形成很高的负电荷，提高 Vg 的溶解度或提供一个螯合金属离子（如钙离子、铁离子）区。Vg 的去磷酸化，会引起卵母细胞对它们的摄入减少。由于 VgR 能识别磷酸化残基，因此，磷酸化对 Vg 的摄取或保持三级结构均有作用。家蚕的 Vg 在胚胎发育中进一步磷酸化还可能成为水解蛋白的起始信号（LaFleur 等 1995、Chen 等 1997）。

## 1.3 Vg 前体切除的位点

大多数已知序列的昆虫 Vg，在脂肪体内切除后形成 2 个亚单位。酶切位点的主题是（R/K）X（R/X）或 RXXR。由类枯草杆菌蛋白内酶作为转化酶能作出特异性识别。另外，该族蛋白内酶的最佳识别，需要 β-折叠的引导或后导。伊蚊脂肪体特异性转化酶已经得到克隆和测序，它在离体的转录/翻译系统中，与伊蚊 Vg 协同表达，以协调转化酶对 Vg 前体的切除。伊蚊卵黄蛋白转化酶（VC）的基本结构与人和果蝇 furins 以及另 1 种转化酶 dKLIP-1 相似，伊蚊的 VC 和果蝇转化酶的天然结构不同，推测蚊子的 VC 自动活化的切除位点是 1 对双碱基主题 $RAKR^{211}$-$RPKR^{215}$。

## 1.4 进化与同源性

系统发育分析表明，家蚕和舞毒蛾两者的 Vg 有密切关系，它们切除点的变动不是区

位移动的结果。虽然一般认为线虫是很原始的进化单位，但昆虫的 Vg 的分化，看来远在线虫和脊椎动物 Vg 分化之前就已经产生了。这种蛋白质的演化与系统分类之间的矛盾是由于各种 Vg 系统中不同的进化速率造成的；或者是等位基因随机的谱系重排的结果，导致分类与基因树同时分化。而基因分化总是出现在分类学特异性分化之前。序列比较和分类系统分析也证明哺乳动物丝氨酸蛋白脱辅基脂蛋白 B-100〔主要蛋白组分为低密度脂蛋白（LDL）和 LDL 受体的其他配体〕是由 Vg 的祖先演化来的。

最近 Hagedorn 等（1998）以经过选择的高等双翅目的 YP 序列进行了多重比较分析，认为 YP 和 Vg 有 1 个共同的远亲祖先，并存在趋同进化现象。序列中严格保存的 Gly、Pro 或 Cys 等主要氨基酸，能决定它们的二级结构。Chen 等（1997）指出，昆虫、线虫和脊椎动物的 Vg 之间存在同源性，在 YP400 + 位置上，残基超过半数的是 Gly、Pro 或 Cys，只有 2 个 Pro 残基是保守的，机率不超过 2.72。这些试验结果与 YP 和 Vg 相关的假设不符。

相反，Hagedorn 的蛋白序列统计比较表明，YP 和 Vg 中含＞50％的疏水性氨基酸（Len，Ile，Val，Met，Phe 相结合的）和亲水性氨基酸（Arg，Asp，Asn，Glu，Lys 相结合的）。在序列中含有很多亲水脂的 α-螺旋的特征。疏水与亲水表面分别与脂类和水相互作用，外表面有很多变异。亲水与疏水残基的周期性出现，其序列形成 1 个亲水脂螺旋，结果其相似性高于预计的无关蛋白组中的序列，从功能区域中比较螺旋结构时可以发现，YP 和 Vg 同起源的可能性较小。

## 2　卵黄原蛋白的性质

Barnett. 等（1980）曾对 17 种昆虫纯化的卵黄原蛋白及其亚单位的结构分子量进行了比较（表 10-1）。

表 10-1　Vg 和 Vn 的分子量及亚基组成

| 昆虫种类 | 分子量（$1\times10^3$u） | | | | | 糖脂含量（%） | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 卵黄蛋白质类型 | 天然卵黄蛋白 | 前体蛋白 | 亚单位 | | 脂 | 糖 |
| | | | | 大 | 小 | | |
| 蜚蠊目 | | | | | | | |
| *Blattella germanica* | Vg | 652 | 250 | 160～100 | 50 | 15 | 7 |
| *Leucopheae maderae* | Vg | 559 | 179～260 | 118 | 57 | 7 | 8 |
| *Periplaneta americana* | Vn | 440 | — | 140～135 | 62/59 | — | — |
| 直翅目 | | | | | | | |
| *Locusta migratoria* | Vg | 550 | 265～250 | 120 | 53 | 8 | 11 |
| 半翅目 | | | | | | | |
| *Oncopeltus fasciatus* | Vn | 470 | — | 160 | 60～55 | — | — |
| *Rhodnins prolixus* | Vn | 460 | — | $160^+$～$160^-$ | 59～50 | — | — |
| 鳞翅目 | | | | | | | |
| *Hyalophora cecropia* | Vg | 516 | 220 | 180 | 47 | 9 | 1 |
| *Philosamia cynthia* | Vg | 500 | — | 120 | 55 | — | — |
| *Bombyx mori* | Vn | 440 | — | 180 | 42 | | 73 |
| *Manduca sexta* | Vg | 260 | — | 180 | 50 | 11 | 3 |
| *Galleria mellonella* | | | | 159 | 74/44/37 | | |

（续）

| 昆虫种类 | 分子量（$1\times10^3$u） | | | | | 糖脂含量（%） | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 卵黄蛋白质类型 | 天然卵黄蛋白 | 前体蛋白 | 亚单位 大 | 亚单位 小 | 脂 | 糖 |
| 鞘翅目 | | | | | | | |
| *Tenebrio molitor* | Vn | 460 | 204 | 160 - 143 | 56 - 45 | — | — |
| *Anthonomous grandis* | | | | | | | |
| 双翅目 | | | | | | | |
| *Drosophila melanogaster* | Vn | 190 | 45 - 46 | 无 | 44 ~ 46 | — | 8 |
| *Calliphora erythrocephala* | Vn | 210 | — | 无 | 46 ~ 51 | — | - |
| *Lucilia cuprina* | Vn | 190 | — | 无 | 49/47/45 | — | — |
| *Aedes aegypti* | Vg | 350 | 170⁺/170 | 170 | 无 | — | — |
| 膜翅目 | | | | | | | |
| *Apis mellifera* | Vg | 210 | 190 | 190 | 无 | — | — |

资料来源 Barnett 等（1980）

在研究过的大多数昆虫种类中，Vg 都含 2 个或 2 个以上的亚单位，仅少数种类为 1 个亚单位，属大分子寡聚糖的磷脂蛋白，在脂肪体内首先合成单个前体物，天然分子量（210～652）$\times10^3$u 或者（200～700）$\times10^3$u，其中大的亚单位（150～200）$\times10^3$u，小的（40～65）$\times10^3$u。简单地说，极大多数昆虫的卵黄原蛋白由 $150\times10^3$u 和 $65\times10^3$u2 个亚单位组成。例如，家蚕的卵黄原蛋白是 1 种球形分子，天然分子量 $440\times10^3$u，由异质四聚体组成，2 个大亚单位形成“重链（heavy chain，VH)”，2 个小亚单位形成“轻链（light chain VL)”，大小亚单位分子量分别为 $180\times10^3$u 和 $42\times10^3$u（Izumi 等 1980）。Vg 和 Vn 之间除了脂的组成有区别以外，后者还进一步磷酸化，其他结构无明显差异。高等双翅目昆虫的卵黄蛋白有很大特异性，一般有 2～5 个互不相同的亚单位组成，每个亚单位的分子量（44～51）$\times10^3$u。

Vg 的等电点范围 pH6.1～6.3。由不同的亚单位组成的 Vn，具有多种物理性质。例如，马得拉蜚蠊（*Leucophaea maderae*）的 Vn 具有 14 和 28S（Dejmal and Brookes，1972）2 种沉降系数，德国小蠊（*Blattella germanica*）的 Vn 沉降系数为 18 和 31S（Storella，and Kunkel，1979)，同时存在免疫及电泳差异，如细腰湿木白蚁（*Zootermopsis angusticollis*)、果蝇（*Dorosophila* sp.)、家蟋蟀（*Acheta domesticus*）等都有类似情况。

用 Vg 抗体测定 Vg 各亚单位在天然分子中的相对位置表明，在烟草天蛾中小单位脱辅基蛋白（apo Vg - Ⅱ）存在于天然 Vg 分子内部，因此，apo Vg - Ⅱ 抗体不与 Vg 或 apo Vg - Ⅰ 的大亚单位产生反应，而抗体在 Vg 或 apo Vg - Ⅰ 之间有交互反应。相反，埃及伊蚊两种 Vg 亚单位单克隆抗体对天然分子产生交互反应，说明这两种亚单位均暴露在含水环境中。

在 Vg 和 Vn 中，含有 1%～14% 的糖类，6%～16% 的脂类及大约 84% 的氨基酸。Vg 和 Vn 中高甘露糖（high mannose）是十分保守的结构，这是保持其功能所必需的。高甘露糖侧链对卵母细胞膜受体识别 Vg 具有重要作用，它引导 Vg 进入细胞膜，从而形成被膜小泡或溶酶体，Vg 中的糖类还保证了 Vg 在某种程度上的稳定性，避免它在分泌前聚集。Vg 中的脂类包括中性脂、甾醇及磷脂等。Vg 进入卵母细胞后，会丧失部分脂。因

此，Vn中含有的脂类较Vg少，Vg中含有较高的天冬氨酸和谷氨酸，而甲硫氨酸含量很低，和一般血淋巴蛋白相似。

埃及伊蚊的Vg和Vn的2个亚单位，分子量分别为$200\times10^3$u和$65\times10^3$u，与寡糖相结合，形成糖基化蛋白，而且全部磷酸化，其中以甘露醇寡糖为主。在德国小蠊、烟草天蛾和家蚕中只有大亚单位发生糖基化，而且是非专一性的。家蚕Vg中含有3%的甘露糖，以共价键与天冬氨酸残基连接。各种Vg与Vn对β-N乙酰胺基葡萄糖酶H（Endo-H）都很敏感，说明糖基均属高甘露糖型，并不形成共价键复合体寡糖，无论在脂肪体内后翻译过程中或者卵母细胞内吞之后都是如此。

烟草天蛾和埃及伊蚊磷酸化的Vg，经脱脂或用Endo-H处理以后，在Vg中释出少量的磷酸，说明磷酸是与Vg中氨基酸结合的；在吸血蝽中，曾有报道，在甘露醇残基上出现磷酸化，这种糖基化与磷酸化结合只是个别现象。

黄猩猩果蝇和埃及伊蚊中Vg的硫化是分泌成熟蛋白的1种需要，这可能在昆虫纲中属普遍现象。

## 3 卵黄蛋白的前体与载脂蛋白

cDNA的克隆和基因序列的获得，加深了对昆虫卵黄蛋白质结构的了解。在家蚕中，从卵黄发生期雌虫的脂肪体mRNA中，用特异性VH与VL抗体，对构建的λ表达文库进行筛选，获得了cDNA克隆系列。这些cDNA克隆的限制性基因定位分析表明，所有的克隆是彼此重叠的。进一步用与脂肪体mRNA与cDNA探针的诺森（Northern）杂交结果可以看出，卵黄发生期雌虫内，单个6kb RNA与所有cDNA克隆的杂交，并从结合的各cDNA的核苷序列推导出单个编码1 782氨基酸的开放阅读框架。

推导的氨基酸序列中，在11个疏水性残基之后有一个正电荷的氨基酸末端（Met-Arg），这些残基是1个跨膜的信号序列。从脉冲标记试验和离体翻译的研究结果来看，家蚕卵黄原蛋白的两个亚单位为是由各自的mRAN编码的。然而，根据化学测定结果，从主要结构上VH和VL的氨基酸末端序列表明，两个亚单位起源于分子量$200\times10^3$u的单一前体肽，在卵黄发生期，雌虫体内脂肪体微粒体中与VH和VL的抗体都能产生反应。

在推测卵黄原蛋白前体的主要结构中，丝氨基残基群位于两个十分接近的氨基酸区域内，在鸡与爪蟾（*Xenopus laevis*）的卵黄蛋白中，磷酸化的丝氨酸残基集中在卵黄高磷蛋白（phosvitin）部分。在家蚕和脊椎动物的卵黄蛋白之间没有发现主要结构上的相似性。在众多的种类中，丝氨酸成群对称地位于卵黄原蛋白前体的切除点两侧。它们的出现可以说明卵生动物后期转译过程中一些机制。

昆虫的卵黄原蛋白虽然是经过脂化的，而且含脂量很高，但它在卵的总脂含量中并不高。卵细胞与各种组织之间的脂类运送都由载脂蛋白（lipoprotein，LP）承担。LP的比重较轻，通常分为低密度载脂蛋白（lowdensity lipoprotein，LDLP）、高密度载脂蛋白（highdensity lipoprotein，HDLP）和极高密度载脂蛋白（veryhihgdensity lipoprotein，VHDLP）3种，它们的脱辅基蛋白Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ，分子量分别为$245\times10^3$u、$78\times10^3$u和$18.3\times10^3$u（表10-2）。

## 4 滤泡特异性蛋白

由于 Vg 在卵内含量丰富，而且容易纯化，因此，早期很多研究工作均集中在 Vg 方面。近年来随着蛋白质分离技术的进步和分子生物学的发展，研究者开始探索 Vg 以外的卵内蛋白质，已经先后纯化和鉴定了家蚕的 30kDa 卵黄蛋白和卵特异性蛋白。烟草天蚕与惜古比天蛾中存在的微卵黄原蛋白（microvitellgenin mVg），飞蝗的 $21\times10^3$u 蛋白，它们的共同特点是在滤泡细胞内合成（表 10-2）。

**表 10-2 几种与 Vg 相关的卵内蛋白质**

| 昆虫种类 | 卵黄蛋白质类型 | 分子量 ($1\times10^3$u) | 辅 基 | 合成部位 |
|---|---|---|---|---|
| 高等双翅目 | YPⅠ-Ⅴ | 44～51 | | |
| 烟草天蛾 | 微卵黄原蛋白（mVg） | | | |
| | 滤泡特异性蛋白Ⅰ（FSPⅠ） | 亚单位 65 | 糖基化、磷酸化 | 滤泡细胞 |
| | 滤泡特异性蛋白Ⅱ（FSPⅡ） | 140<br>35 | 糖基化 | |
| 家蚕 | 特异性卵黄蛋白（ESP） | 72<br>(74～69) | 脂化、糖基化、磷酸化 | 滤泡细胞 |
| | 30kDa 卵黄蛋白 | 30 | 脂化、糖基化 | 脂肪体 |
| 惜古比天蚕蛾 | 拟卵黄原蛋白（pVg） | 70 | | 滤泡细胞 |
| | 载脂蛋白（LP） | | | |
| | 低密度载脂蛋白（LDLP） | 245 | 脱辅基Ⅰ（apoⅠ） | |
| | 高密度载脂蛋白（HDLP） | 78 | 脱辅基Ⅱ（apoⅡ） | |
| | 极高密度载脂蛋白（VHDLP） | 18.38 | 脱辅基Ⅲ（apoⅢ） | |
| 大蜡螟 | 滤泡特异性卵黄蛋白 YP4 | 37 | 硫化、糖基化、磷酸化 | 滤泡细胞 |
| | 滤泡特异性卵黄蛋白 YP2 | 44 | | 滤泡细胞 |

此外，尚有一些蛋白属于酶类，如家蚕半胱氨酸蛋白酶（bombyx cysteine proteinases，BCP）和埃及伊蚊的羧基蛋白酶（VCP）等，这些蛋白质均产生于脂肪体内。

惜古比天蚕蛾的亚卵黄原蛋白（paravitellogenin）和家蚕卵中分子量 $30\times10^3$u 的卵特异卵蛋白（egg specific protein，ESP），都是滤泡细胞合成的，在蛹中期沉积到卵细胞中。从烟草天蛾中也分离到两种滤泡特异蛋白（follicle-specific proteins，FSP）。它们唯一的合成部位是发育中的滤泡细胞，出现于卵母细胞结束卵黄原蛋白的内吞而卵壳尚未形成的时候。烟草天蛾的 1 种 FSP-Ⅰ，分子量 $130\times10^3$u，由 2 个 $65\times10^3$u 的亚单位组成，该蛋白经过糖基化与磷酸化。另 1 种 FSPⅡ由 $140\times10^3$u 与 $35\times10^3$u 两个亚单位组成，只有糖基化而没有磷酸化。烟草天蛾的 mVg 中没有任何辅基化。ESP 的 1 889bp cDNA 已被克隆和测序，在 cDNA 中含有 1 677bp 以及 5' 内部编码区或 3' 非编码区，推测氨基酸序列中有一个锌结合区。

Shirk（1987）和 Raiaratnam（1996）报道，大蜡螟有 4 种卵黄原蛋白（YP1-4），其中 YP1 和 YP3 由脂肪体合成，而 YP2 和 YP4 由滤泡细胞合成，也属滤泡特异性蛋白。YP4 cDNA克隆表明，有 1 050～1 100bp，蛋白质分子量 $37\times10^3$u，与双翅目 YP5 相似，这在鳞翅目昆虫内是非常特殊的。

30kDa 蛋白作为家蚕的第 2 种主要蛋白，都是脂化和糖基化的，而且又是磷酸化的，

不但在发育中的卵母细胞内很丰富，而且出现在雄虫和雌虫末龄幼虫的后期到早期蛹的血淋巴中。30kDa 蛋白至少有 5 种组分，它们之间分子量氨基酸序列和代谢方式比较相似（Zhen 等 1986，Sakai 等 1988），mRNA 已由 Sakai（1988）从家蚕 5 龄幼虫中期脂肪体中分离到，mRNA 长 700～900bp，带有一个相对较短的 5' 翻译区和 poly A（聚核苷酸）尾巴，从 cDNA 序列推导不同的亚单位，主要结构间有 65%～90% 的相似性，20 个残基（起始于 Met-Lys 或 Met-Arg）的信号区可能是高度变化的，在 30kDa 蛋白与卵黄原蛋白亚单位之间，主要结构无相似性。

胚胎发生时，卵内 ESP、Vn 和 30kDa 蛋白均由特异性蛋白酶水解，为胚胎提供各种氨基酸。

## 第二节 卵黄蛋白的基因及其表达

昆虫纲中 Vg 基因根据亚基分子量分为 3 种类型：第一种为含 $180\times10^3$u 和 $50\times10^3$u 2 种亚单位的基因。原始昆虫及现存大多数种类（如飞蝗）的 Vg 基因所转录的 Vg，原始分子量为（200～250）$\times10^3$u；第二种是膜翅目及低等双翅目昆虫（如埃及伊蚊），Vg 基因中编码小亚单位的部分缺乏或不表达，只有编码大亚单位的那一部分具有转录活性，因此只有一个大亚单位组分；第三类是高等双翅目昆虫（如果蝇、家蝇），Vg 基因编码大亚单位的一部分缺失或失去表达活性，只编码小亚单位。在各种型中，可能会出现复增或突变，产生不同大小的活性基因及其产物。

### 1 基因定位与结构

家蚕卵黄原蛋白的基因克隆已通过 cDNA 探针的筛选，从基因文库中分离得到。从 cDNA 与基因克隆之间的序列进行比较，显示出卵黄原蛋白基因长度达到染色体中 DNA 的 13kb 区，由带 4 个不同长度的内含子的 5 个外显子组成，得自雄虫和雌虫蛹中的基因组 DNA 的定量索森杂交，充分说明基因位于常染色体上，TATA 区位于转录起始点 30bp 的上游。

30kDa 蛋白基因在染色体上的位点，已经通过重组分析，定位于染色体 20 上，邻近白霜半透明基因（hoarfrost translucent gene）。各个基因的克隆序列证明，染色体 DNA 的 45kb 区同一方位有 3 个 30kDa 蛋白基因，相互之间距离约 10kb。每个基因有 1 个短的第 1 外显子与 1 个编码蛋白的第二外显子组成。该外显子由单个 700～800bp 的内含子所分隔。烟草天蛾中微卵黄原蛋白基因的外显子/内含子组成以及核苷酸序列与 30kDa 蛋白的基因相当一致。

在飞蝗中，两个对卵黄原蛋白编码的基因（VgA 和 VgB）已得到克隆。VgA 和 VgB 位于 X 染色体上，分别长 12 和 10.5kb，它们之间除 5' 末端以外，在编码区有部分同源性。两个基因含几个内含子为 6.3kb 的 mRAN 编码，卵黄原蛋白 mRAN 的主要翻译产物是 185kDa 蛋白，从两个基因转录起始位点 500bp 上游，有几个相似的阻断区。其中两个与蜚蠊卵鞘蛋白基因上游 12bp 的几个单位相配对，该基因受到保幼激素的调控。VgA 和 VgB 的第一个基因外显子分别为 56 和 58bp，推测编码成为 10 个氨基酸残基的信号序列，

它们在核酸水平上87%是完全相同的。交叉杂交试验表明，VgA和VgB的编码区除第一外显子以外，有一部分同源性。

在黄猩猩果蝇中，在X染色体上有3种卵黄蛋白质（YP）基因，已经得到克隆和测序。YP1、2和3基因分别编码420、442和439个氨基酸残基。3种蛋白的每个多肽对之间约有50%是相同的。YP1和YP2基因紧密排列成头—头相连，并且分开进行转录。这些基因被常见的1 227bp启动子区所分隔。该启动子调节性别和组织特异性基因的表达。YP3基因离YP1和YP2基因至少有106bp，并受自身启动子的调节。YP1和YP2基因的调节作用知道得比较多，有两个强化因子序列在卵巢中表达，即卵巢增强子OE1与OE2。OE1区正好在YP2转录起始点的上游−43到−343位点上，而OE2区位于YP2第一个外显子中+4到+108位点上，它增强卵巢中YP1的表达。上游−196到−323处的转录启始点，有1个序列称为脂肪体增强子（FBE），涉及成虫脂肪体中YP1基因正常的时期和性别的特异性表达。

Rajaratnam（1996）报道了大蜡螟滤泡细胞特异性卵黄蛋白YP4的cDNA的核酸序列。cDNA的长度约960bp，含单一开放阅读框架，编码286个氨基酸的多肽，带有1个疏水性序列和2个糖基化和酪氨酸硫化点，编码产生卵黄蛋白YP4，分子量$37\times10^3$u。YP4基因是单拷贝基因，用cDNA5’和3’端引物进行PCR分析，表明YP4基因编码区缺内含子。

## 2 性别依赖性

昆虫的卵黄蛋白像脊椎动物卵黄蛋白一样，是生物化学上的第二性征。在高等脊椎动物中，第二性征的表达是在性激素控制下进行的，而在昆虫中，尚未发现脊椎动物性激素那样的性特异性体液因子（sex-specifil humoral factor）。蜕皮甾醇和保幼激素在某些昆虫中对卵黄原蛋白的诱导作用已经具有丰富的证据。这些激素是对两性都起作用的。作为卵黄发生的诱导因子，它们对脂肪体细胞来说只在特定的发育阶段才能被识别。说明卵黄发生的雌性属性主要决定于脂肪体细胞的自身特征，而不是血淋巴环境的作用。

在家蚕中，血淋巴蛋白二型性表达，主要决定于脂肪细胞中的性染色体组分。卵黄原蛋白作为1个主要的血淋巴蛋白，在末龄幼虫期呈现雌性特异性表达。Izumi等曾用性镶嵌突变体来验证是否存在性特异性体液因子，如果存在的话是否与SP1和Vg一起参与性的表达。他们利用的是家蚕MOK101品系，该品系在常染色体上有突变体mo基因。带有纯合的mo基因的雌虫，在成熟过程中约有30%的卵受影响，保持带原核的第一极体。在受精时，极体和原核各自携带不同的性染色体（Z或W）与通常带有Z染色体的精子形成syrcharions，出现2个双极核与1对syrcharions，分裂生成两性嵌合体。

从单个性镶嵌的末龄幼虫上，解剖出部分脂肪体组织，分别进行离体培养时，一部分组织的制备品与正常雌虫的相似，能够合成大量的SP1，而另一些不能合成SP1。由此可见，在普通血淋巴环境中每种细胞型独立地表现出它们的性别依赖性（sex-dependency），排除了性特异性体液因子参与SP1性二型表达的可能性。进而又表明蛹血淋巴中Vg的水平与每个性镶嵌体中幼虫血淋巴SP1有惊人的相关性。当末龄幼虫合成SP1的脂肪体细胞在化蛹蜕皮时就合成卵黄原蛋白。也就是说，卵黄原蛋白合成的雌性特异性受遗传控

制，而不受卵巢发育的控制。

在黄猩猩果蝇中，YP 基因受性别决定基因的阶梯系调控，使雌性特异基因得到表达。这些阶梯系中最后的调节基因是 dsx 基因。所有体细胞的性别分化都决定于 dsx 基因。在一般 X/X 动物中，dsx 基因产生雌性依赖蛋白 DSXF，在 X/Y 动物中产生雄性依赖蛋白 DSXM。近年来研究结果表明，DSXF 和 DSXM 是一类 DNA 结合蛋白，YP1 和 YP2 的启动区中对 DSX 蛋白有 3 个结合位点。

## 3 翻译后切除

如上所述，家蚕卵黄原蛋白的每个亚单位出自单个前体肽。在 VL 的 Edman 降解中，获得 1 个氨基末端序列 X-X-F-S-S-Q-S-T-，它位于推导的基本结构的 16～25 位点上，VH 的氨基末端序列是 S-K-L-V-T-V-H-K-V-L-，并以 S-Y-M-X-X-K-L-V-T 序列作为 VH 的 1 个弱信号。该序列位于它的 371～390 和 367～375 处。原蛋白和原激素那样的前体肽，通过内分泌细胞的调节途径，受到内蛋白酶的切除。最常见的酶切点是在配对的碱基（K-L 和 R-R）之后，更普遍的是在（K/P)-X-(K/R)-R 主题之后。在高尔基体中，测到对肽的切除起重要作用的类枯草杆菌蛋白酶（subtilicin-like protease)。与主题 R-S-R-R 完成相同的序列在家蚕卵黄原蛋白推导的基本结构 363～366 位点上，紧接 S-Y-M-R-S-K-L-V-T 是 VH 的氨基末端序列，只作为 1 个次要信号。根据这此事实，Izumi 等（1994）指出，信号肽移除之后的卵黄蛋白前体，首先在 366～367 之间，以后在 370～371 之间切除，从而获得成熟的 VH。

关于某些昆虫 Vg 的合成过程中，对卵黄原蛋白前体肽的翻译后切除已有详细报告。在埃及伊蚊中，卵黄原蛋白首先合成的是 $220\times10^3$u 前体，以后切成两个亚单位。飞蝗与马得拉蜚蠊的卵黄蛋白由多个亚单位组成，这些亚单位均起源于一个大分子前体肽。在德国小蠊中，$160\times10^3$u 的大亚单位被切成 $95\times10^3$u 和 $55\times10^3$u 两类多肽。值得注意的是许多作者报道，酶切产生的亚单位分子量并不完全一致，可能是试验方法和条件不同造成的。

Chen（1994）报道了埃及伊蚊等 4 种昆虫的卵黄原蛋白前体的结构，他指出，除了高等双翅目昆虫以外，极大多数昆虫的 Vg 前体分子量均在 200～700u $\times10^3$ 范围内，在脂肪体中合成以后，由内切酶切成大小两个亚单位，切除点由 4 个氨基酸为前导，在伊蚊中为 RXRR，家蚕中为 RSRR，所切的左侧为 $\leqslant50\times10^3$u 的小亚单位，右侧为 $\geqslant150\times10^3$u 的大亚单位。切除点两侧存在两个丝氨酸区，C 端有第三个聚丝氨酸区。此外，紧靠 N 端有 1 个富丝氨酸区。参与切除的都属类枯草杆菌蛋白内切酶。在伊蚊中卵黄高磷蛋白区有 1 个磷酸化的结合点，和卵生脊椎动物相似，为胚胎发育提供磷和钙（这在卵生动物中是普遍存在的一种适应性）。

## 4 后期修饰

昆虫的卵黄原蛋白翻译同期和翻译后期的修饰都发生在脂肪体内，最普遍的是-N 键的糖基化作用，它并不限于大亚单位中。如伊蚊 Vg 的氨基酸序列中小亚单位可能有 5 个-N 键糖基化作用点（NXS/T），而大亚单位中多达 12 个。在棉铃象甲（*Anthonomis grandis*)、1 种细枝象（*Cylindrocopturus adspersus*)、两种小爪象（*Smicronyx fuluus*、

*S. sordidus*）Vn 中，除去 N-键上的糖基，大亚单位中分子量大约减少 9% ~10%，小亚单位中减少 13%～17%。在家蚕中 Vg 有 5 个糖基化点（Raikhel 等 1992）。伊蚊的 Vg 在分泌到血淋巴之前就被磷酸化或硫化。推断有 13 个硫化点和 99 个磷酸化点，还交叉在两个亚单位上。

在血淋巴中，大量脂通过低密度脂蛋白（low density lipophorin，LDLP）积聚到卵母细胞内。在美洲蜚蠊中，纯化后的 Vg 重量的 8% 是脂类，其中 71% 是磷脂，25% 是甘油二酯，2% 是甾醇。

在雄性马得拉蜚蠊中，用烯虫酯（methoprene）诱导以后，和雌虫一样能获得 Vg，但含量较低。Vg 的转录糖基化与磷酸化作用也与雌虫相似。从亚单位的含量来看，雄虫的 112、95×$10^3$u 极少，但 85×$10^3$u 明显超过雌虫。Chen 等（1994）指出，雌虫和雄虫脂肪体内蛋白酶有显著差异，雄虫体内酶的活性远大于雌虫。因而使雄虫体内 112 与95×$10^3$u 的多肽含量减少。许多半变态昆虫中，卵黄原蛋白由多个分子量不同的亚单位组成，飞蝗的卵黄原蛋白亚单位也具多型性，起源于 1 个前体肽，经后期转译和修饰才成为数个亚单位。马得拉蜚蠊卵黄原蛋白亚单位的切除和修饰过程如下：

单基因

↓

VgmRNA

↓　　　　　　　　　　　　性别决定与发育期

190×$10^3$u　原始翻译产物

↓　　　　　　　　　　　　翻译同时糖基化

203×$10^3$u　卵黄原蛋白前体

↓

220×$10^3$u　　　　　　　　翻译后磷酸化

↓　　　　↓

112×$10^3$u　155×$10^3$u　　　　蛋白水解过程

　　　　↓　　↓

85×$10^3$u　91～95　54×$10^3$u　　分泌进入血淋巴中

## 第三节　卵母细胞对卵黄蛋白前体物的摄取

在卵黄发生期，大量的 Vg 由脂肪体合成后分泌到血淋巴中，然后被输送到卵巢并为发育中的卵母细胞所摄取。Telfer（1961）在惜古比天蚕蛾中发现，在沉积卵黄前，滤泡细胞间和卵母细胞间出现间隙，而且间隙随摄取能力增强而增大，这就是“滤泡开放”（patency）。Roth 与 Porter（1964）首先证明埃及伊蚊的 Vg 通过受体吸附然后形成被膜小泡（coated ecsicle），并转移到细胞内成为内吞胞（endosome）。内吞胞依赖于氧化磷酸化提供能量，导致 Vg 和受体的分离。受体可再循环进入细胞膜。Vg 被内在化后积贮成卵黄颗粒。Vg 及其受体间的作用成为摄取的跨膜信号，它具有高度的特异性和选择性。

有关细胞的选择性摄取与受体调控细胞内吞方面的知识最初来自对脊椎动物，研究并发现了运载胆甾醇的低密度载脂蛋白以及其他的细胞内吞系统。它们以特殊的蛋白分子作为配体，与细胞膜上的受体结合，成为配体/受体复合体，这种受体引导的细胞内吞，在动物细胞摄取大分子物质中占有非常重要的地位，后来发现昆虫体内也是如此。

## 1　卵黄原蛋白受体

动物的卵母细胞内吞受体，主要是卵黄原蛋白受体（vitellogenin receptors VgR）是一类大分子膜结合蛋白（membrane boundproteins）。脊椎动物的 VgR 分子量为（95～115）$\times 10^3$u。在昆虫中，埃及伊蚊、飞蝗和沙蝗的 VgR 都已得到分离和提纯，分子量比脊椎动物的大 1 倍，为（180～214）$\times 10^3$u（Fereng，1993，Sappington & Raikhel，1995）。

在天然 VgR 的三级结构中，几个亚单位通过二硫键或非共价键形成寡聚蛋白。利用伊蚊 VgR 胰蛋白酶片段的微序列，合成简并引物，并通过 PCR 克隆出大约 600bp 核苷酸的 cDNA 产物，作诺森印迹分析和以聚核苷酸 RNA 为探针，得出 1 个接近 7kp 的 VgR mRNA 转译本，大的单位分子量为 $205\times 10^3$u。以 600bp 的 PCR 产物也用来筛选卵黄蛋白的 cDNA 文库。接近 2.7kb 的 cDNA 得到了克隆鉴定和测序。试验证明，它与低密度载脂蛋白受体（LDLR）同源，但惜古比天蛾的 VgR 可能是高密度载脂蛋白受体（HDLR）。利用酶的降解物，通过 SDS-PAGE 电泳表明，蝗虫 $180\times 10^3$u 的 VgR 在 O-键和 N-键上分别含有 45%～59% 的寡聚糖。Hafer 和 Ferena（1992）认为蚊 VgR 的分子量 $250\times 10^3$u，当内部二硫键被还原时，分子量约 $214\times 10^3$u，大于蝗虫的 $180\times 10^3$u（Sappington，1995）。

伊蚊的卵黄蛋白受体（Ag VgR）只存在于卵巢组织中，而不存在滤泡细胞和滋养细胞中。Sappington 等（1995）利用免疫化学方法测定，它们存在于卵母细胞的表面，出现时间略早于卵黄原蛋白形成期。在蛹蜕皮早期，随着卵黄蛋白的产生，VgR 水平迅速增高。当蚊子吸血以后，卵母细胞开始发育，VgR 急速增加，卵母细胞产生胞膜内陷，细胞内含卵黄蛋白的囊胞积聚，吸血 24h 后 VgR 量下降，Vg 的积累明显减少，至 30h 后 Vg 积累也随即停止。

**表 10-3　昆虫 Vg 受体的比较**

| 目-种 | Kd（nM） | | | M（$1\times 10^3$u） | | mRNA 转录物（kb） | 初级结构 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 膜束缚 | 溶离 | 纯化 | 单聚体 | 全体 | | 氨基酸数 | 相同% |
| 埃及伊蚊 | 180 | 30 | 15 | 205 | 390 | 7.3 | 1 847 | 42 |
| 黄猩猩蝇* | — | — | — | 210 | — | 6.5 | 1 984 | |
| 烟草天蛾 | 13 | - | — | — | — | — | — | |
| 德国小蠊 | 79 | — | — | — | — | — | — | |
| *Nauphoeta cinerea* | 200 | — | | 200 | — | — | — | |
| 飞蝗 | 109 | 42 | 72 | 180 | — | — | — | |
| 沙蝗 | 100 | — | — | 186 | — | — | — | |

（Sappington and Raikhel，1998 综合各作者资料）

## 2　卵黄蛋白受体的结构

Sappington 和 Raikhel（1998）综合了几年来许多研究者对 VgR 结构的研究成果，提

出 VgR 的分子组成包括下列 5 部分（图 10-2，10-3）。

（1）A 级富半胱氨酸重复（classA Cys-rich repeat），属补偿型（complement-type）或配体结合重复；

（2）B 级富半胱氨酸重复（classB Cys-rich repeat），属表皮生长因子型（epidermal growth factor type，EGF-type）；

（3）YWXD 重复；

（4）O-键糖基化区存在于跨膜区，有 1 个富丝氨酸/苏氨酸群；

（5）细胞质尾部含-S 内在化信号。

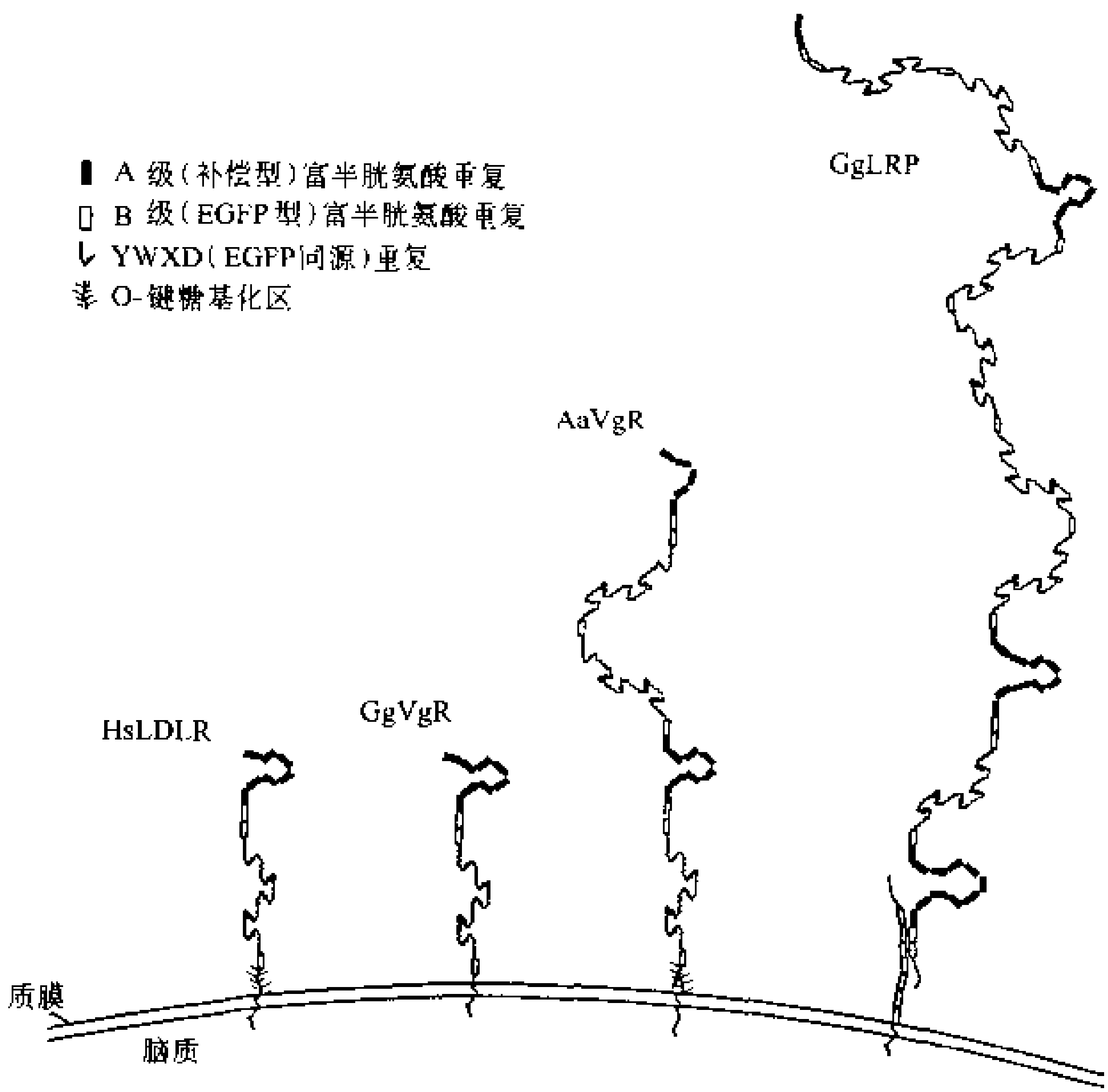



图 10-2　卵黄蛋白受体的结构

HsLDLR-人低密度脂蛋白受体（Yamamoto 等，1984）

GgVgR-鸡卵黄原蛋白受体（Bujo 等，1994）

AaVgR-埃及伊蚊卵黄原蛋白受体（Sappington 等，1998）

GgLRP-鸡 LDLR 相关蛋白（Nimpf 等，1996）

（仿 Sappington 等，1998）

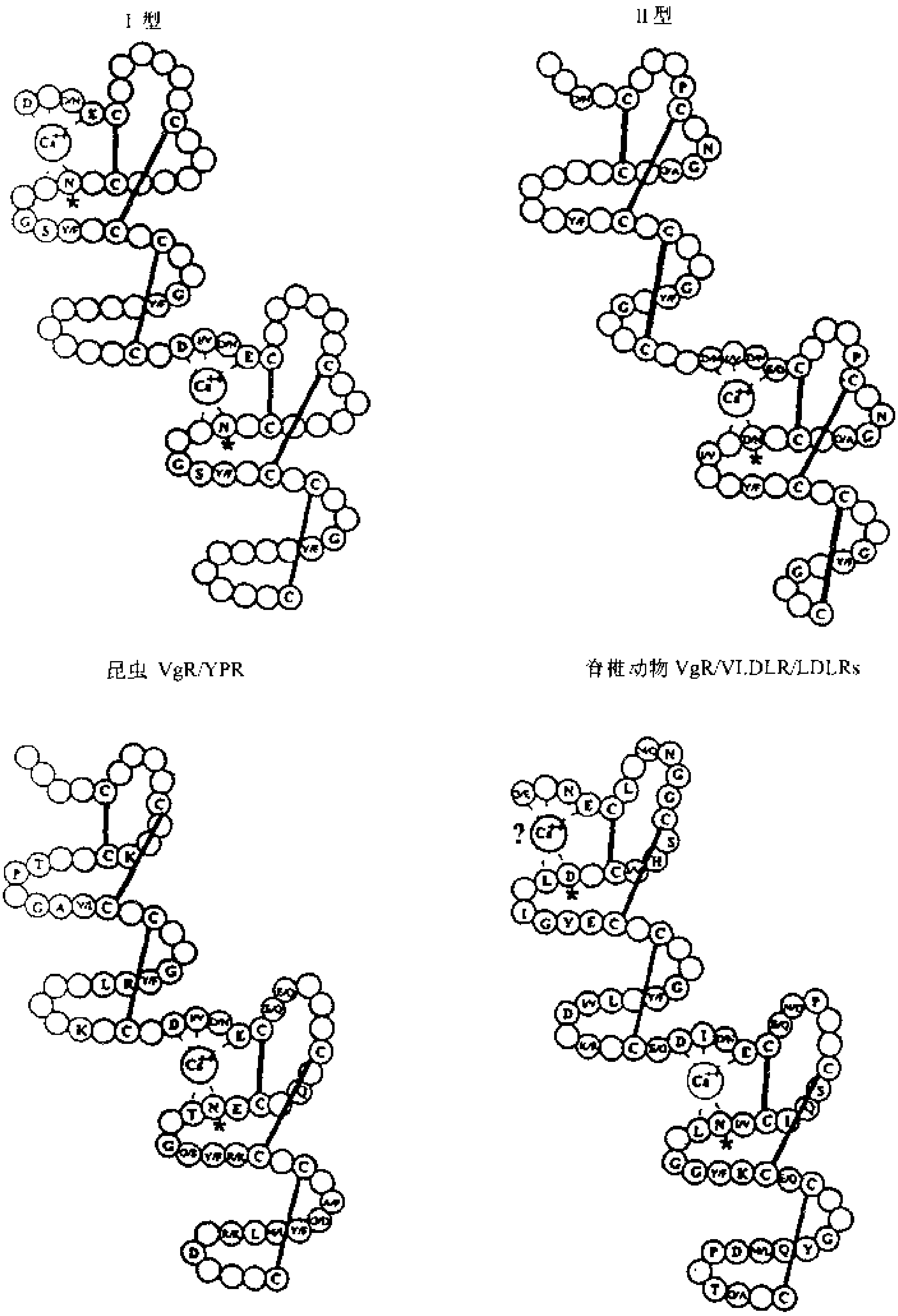



图 10-3 卵黄蛋白受体中 B 级富半胱氨酸区结构

图中粗线示半胱氨酸残基间二硫桥

* 为 β-羟基化残基与 $Ca^{++}$ 结合的主题

(Sappington 等，1998)

### 2.1 A级富半胱氨酸重复区

从人的LDLR天然突变体及其配体的研究中发现A级重复群，其中有1个或多个配体结合区，这些氨基酸区的负电荷残基与配体表面分布的正电荷残基相互作用，引导配体进入细胞。

另外在A级重复中有6C残基，其中包括3个二硫桥（C1-C3，C2-C5，C4-C6），6个酸性（D和E），3个G和2个疏水的残基。它们是高度保守的，贯穿于LDLR族所有成员中，影响到它们的2级和3级结构的形成。Blacklow和Kim（1996）证实，在1个较大的DCXDXSDE突变体中，含有1个连接钙离子的"盒"（box），它是组成单位折叠所必需的，能起到稳定内部结构的作用。

### 2.2 B级富半胱氨酸重复区

约40个氨基酸的B级重复，有6个C残基排列成不同模式，并有多点二硫结合（C1-C3，C2-C4，C5-C6），超过A级重复。在LDLR族蛋白中，B级组成单元成对地串连在A级重复的两边C-末端上，在N-末端也有侧置的单个组成单元，另外在每个B级重复的两边有5个YWXD重复。在某些B级复制中，还含一个钙离子结合主题，由4个残基N-端到第一个半胱氨酸（D/N）X（D/X）（E/Q）Xn（D/N）X4（Y/F）重复，（D/N）是1个β-残基，（Y/E）不与钙离子直接连接，可能是酶的识别点。

B级成对串连的重要性是使受体二聚化。如蚊子VgR在天然凝胶上即呈同质二聚体。LDLR在细胞膜上是二聚体或寡聚体，保留的β-羟基化残基包含在钙离子结合中，β-羟基团氢键参与受体的二聚化。

Vg与VgR在细胞表面形成被膜囊胞，以后在内吞胞中使VgR再循环与B级串连有关，LDLR的突变体缺乏B级串连在酸性pH值下受体不能释出配体，因此阻断了受体的再循环。

### 2.3 YWXD重复区

在昆虫Vg/YPR中，有3个YWXD区，每区含5个重复，每个重复约有43个氨基酸，1个较短的α-螺旋折叠为27个残基构成β层，另有1个折叠，掺入到YWXD主题的最后3个残基上。LDLR族受体基本结构常常因YWXD重复缺失而成为1个隔离区域。YWXD重复多与B级富半胱氨酸重复一起，成为1个与EGF前体同源的单一区。

和A级、B级重复相似，YWXD重复出现在蛋白与蛋白之间相互作用的分子中，它是受体的1个重要功能区。

### 2.4 O-键糖基区

伊蚊的Aa VgR的序列中，从N-末端进入垮膜区是1个富丝氨酸和苏氨酸区（在果蝇YPR中是两个丝氨酸），它的功能还不清楚。在鸡的VgR/LRP中缺乏O-键糖基区。LDLR中该区缺失，并不影响受体与配体结合，也不妨碍受体的再循环。

### 2.5 细胞质尾部

伊蚊的VgR的细胞质尾部有103个残基，是脊椎动物VgR中的2倍。DmYPR细胞质尾部大约60个氨基酸，可能与AaVgR不同源，并富甘氨酸和天冬氨酸残基。所有的LDLR族受体中，在细胞质尾部都隐藏有一个或多个内在化信号。这些信号主题能被连接体（adaptor）蛋白复合体识别。连接体锚定在细胞膜上的靠细胞质一边。受体与连接体结合，使受体能独立接受配体，从而在膜上形成包涵素（clathvin）连接，引起细胞表面内陷。

大多数LDLR族受体的细胞质尾部在β-折叠中都含有1个6个残基的FXNPXY序列。在昆虫的VgR/YPR细胞质尾部缺少酪氨酸而含1～2个二亮氨酸主题或亮氨酸和异亮氨酸主题，成为受体的内部信号，有时它们也是细胞内吞的需要。

## 3 受体的结合动力学

根据VgR的结合动力学研究表明，降解值（Kd）为12～200nM，伊蚊的受体结合状态的VgR粗制提取物Kd为180nM。降解后可溶性提取物为28nM，富集后过剩的可溶性抽提物为15nM（Dhadialla等，1992）。由此说明VgR与Vg有很强的亲和力。飞蝗VgR的Kd与此大致相似，它的配体从束缚膜上测定为109nM，解离时降为42nM。在伊蚊和飞蝗中，只观察到1个结合点。再根据配体和受体的修饰情况，可以观察到受体—配体相互作用的动力学。Raikhel等（1988）曾经将蚊子Vn经纯化后的亚单位作竞争性试验，两个亚单位都暴露在亲水环境中，结果产生了VgR竞争结合位点的现象，从而导致结合失败。而烟草天蛾的小亚单位为大亚单位所包围，情况就不一样（Osir等1986）。

已有的资料说明，Vg与VgR的结合依赖于各自所带的电荷。伊蚊VgR和脊椎动物的LDLR有相似的结合模式，VgR带负电荷，而Vg带正电荷。蝗虫VgR很低的pH（3、4）也说明是带负电荷的。Vg/VgR复合体易被解离，有saramin存在的情况下能够得到保护，这些都说明有1个带负电荷的多硫化芳香基，它与Vg产生竞争性结合。不少研究资料也说明Vg的磷酸化、糖基化和硫化都影响到它与VgR的结合能力，但其中真正的规律还没有完全搞清。

## 4 细胞的内吞过程

VgR分布于卵母细胞膜的微绒毛基部及其附近。卵母细胞膜上，具有结合体受体，而胞质中存在着结合体蛋白。受体尾部的4个氨基酸残基为结合体蛋白的识别部位。

卵母细胞内存在1种网格蛋白，又称包涵素（clathrin），其中重链（clathrin heavy chain，CHC）与轻链（clathrin light chain，CHC）构成三臂体（triskelion）（图10-4）。3个三臂体自身结合后形成“包涵素晶格（clathrin lattice）”或称“多角形笼体”，当它与细胞膜上蛋白体结合时，使膜表面变成被膜小凹而最终形成内吞胞，完成内吞过程（图10-5）。

### 4.1 包涵素

埃及伊蚊的包涵素重链基因已经得到分离和提纯，获得1个16kb基因带有6个外显子。

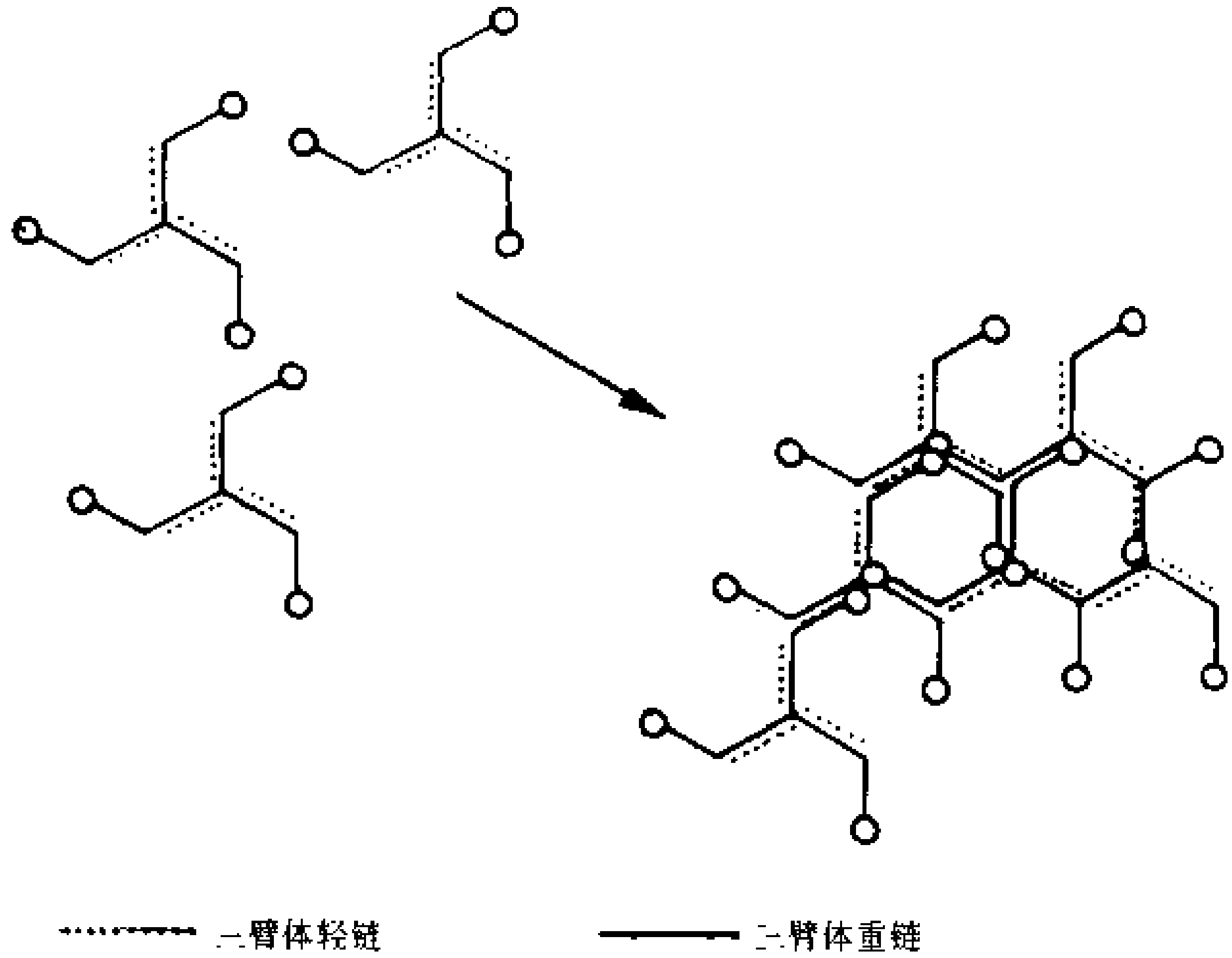



图 10-4　包涵素三臂体结合形成晶格

（仿山本芳实，1995）

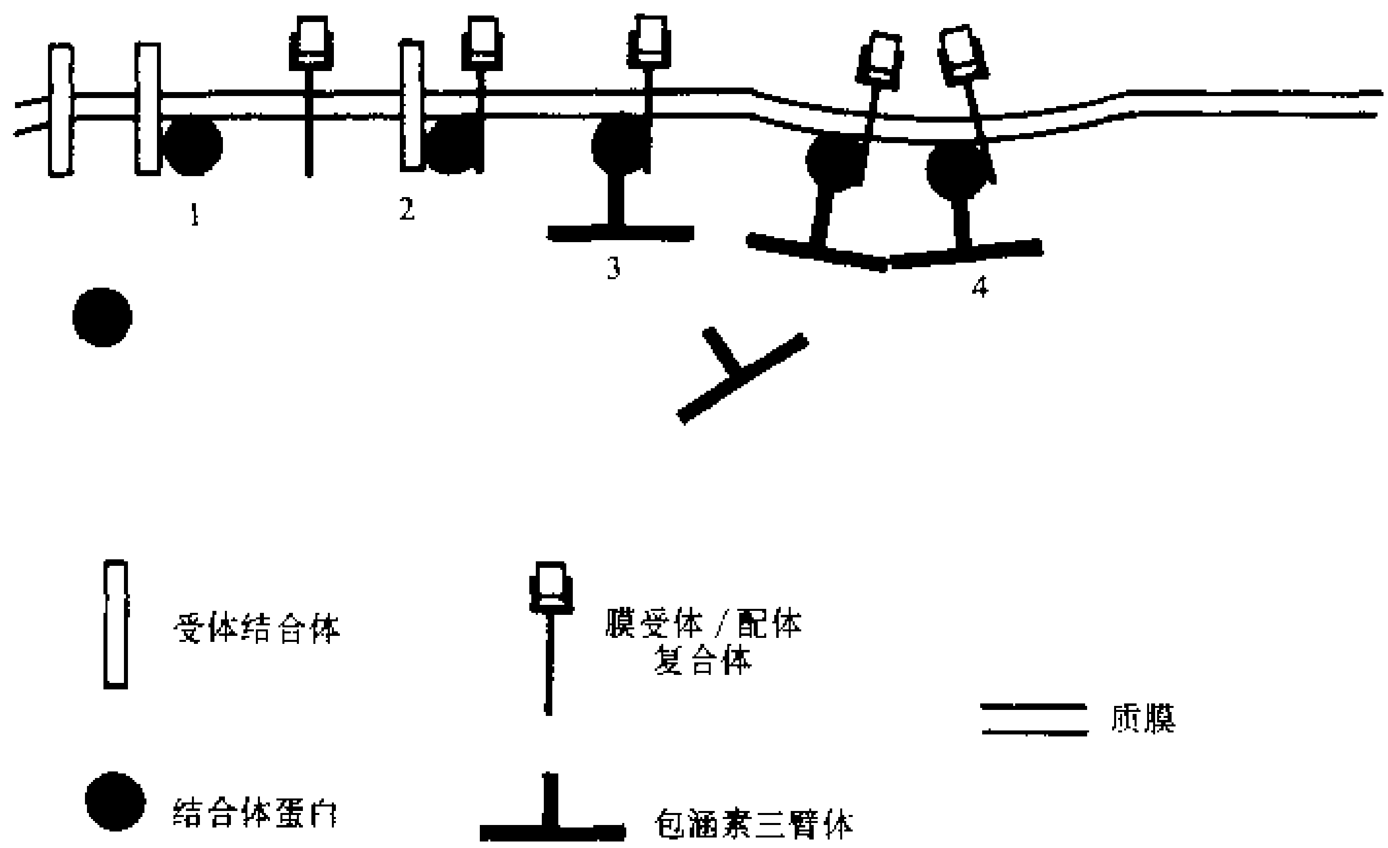



图 10-5　卵黄原蛋白内吞过程中被内膜小凹的形成

1．卵母细胞中一个结合体蛋白附着到与膜结合的受体结合体上

2．受体/配体复合体的尾部与结合蛋白相结合

3．包涵素三臂体与固定在膜上的结合体蛋白相结合

4．包涵体三臂体形成晶格，使质膜内凹

（仿山本芳实，1995）

虽然包涵素在所有组织中均有发现，但它是由卵巢组织中 mRNA 转录的，比体细胞组织的 7.5kb 短 1kb，其差别是由内部 3'-不翻译区的长度不同造成的。卵巢特异性转录本含的富 AU 去腺苷作用的信号主题少于体组织转录本，因此，比较稳定。前卵黄原蛋白期原位杂交试验表明，卵母细胞中 CHC mRNA 在滤泡细胞发育初期就开始表达，具有高度稳定性优势。

### 4.2　内吞后的运转和 Vg 的贮存

Vg 细胞内吞的全过程如图 10-6 所示，首先由细胞膜形成被膜小凹，然后发展成为内吞胞，完成 Vg 的内在化过程。

常用电镜与示踪相结合的技术以及细胞免疫化学方法来研究细胞对蛋白质的内吞途径。Stay 等利用铁蛋白（ferritin）研究了惜古比天蚕蛾、埃及伊蚊和黄猩猩果蝇的细胞内吞，但用得最多的是辣根过氧化酶（horseradish peroxidase），借此了解被膜囊胞的构成和细胞对卵黄蛋白的内吞，然而这种方法不能代表专性配体，因为内吞标记物不能再调整，因此无法了解到再循环过程。

内吞后的被膜囊胞很快愈合成内吞胞，其内含物组成很多微胞中心，有若干微管向外辐射，胞内低的 pH 值使受体和配体分离，受体先积聚在微管部位，再循环到细胞表面，配体积聚到微胞中心（Bu & Schwartz，1994）。

昆虫的 Vg 只存在于内吞胞的囊胞中，烟草天蛾 mVg 和脂蛋白也是这样，不存在于微管臂中。内吞的卵黄蛋白前体积聚到贮存颗粒（即卵黄体）中。当内吞胞中失去微管组分，并和许多内吞胞相互合并时，过渡型卵黄体的量上升，有些昆虫的 Vg 被切除或磷酸化，但大多数种类不再进行加工；有些 Vg 可能去脂后产生结晶，如在成熟卵黄体中的

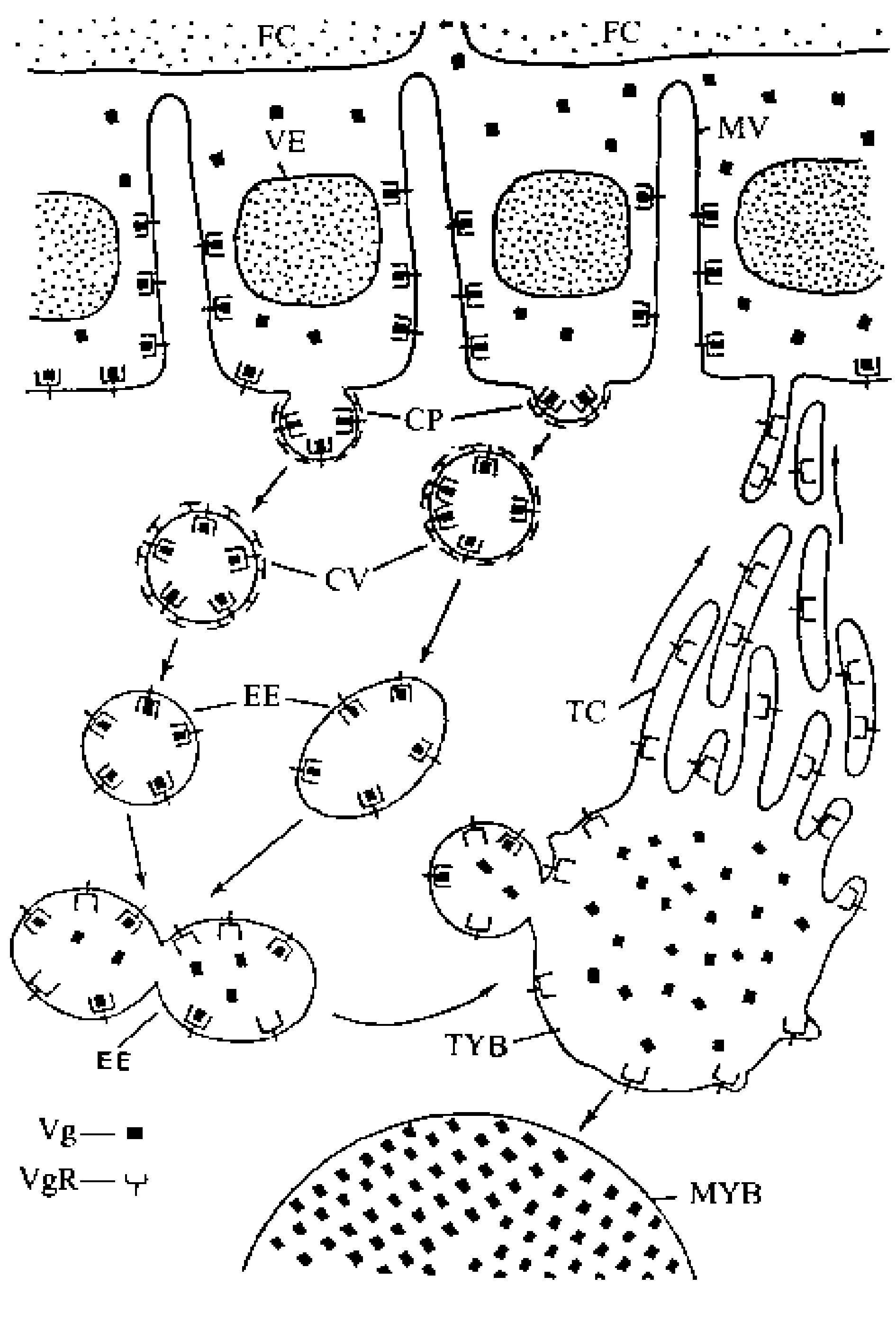



图 10-6　卵黄原蛋白内吞过程示意
卵黄原蛋白经过滤泡细胞间隙和卵黄蛋白膜孔，与膜上受体结合（图中小方块）。包涵素促使卵母细胞膜形成包涵素被膜小凹，进而脱离胞膜成为被膜囊胞，再转化成早期内吞胞。几个早期内吞胞合并，形成过渡型卵黄体，进一步发育为成熟型卵黄体。过渡型卵黄体伸出微管区，受体从此脱离出去参予下一步内吞过程。
FC-滤泡细胞，VE-卵黄原蛋白膜，CP-包涵素被膜小凹，CV-被膜囊泡，EE-早期内吞胞，TYB-过渡型卵黄体，MYB-成熟型卵黄体，TC-微管区。
（仿 Sappington，1997）

Vn。Vg、mVg 和脂蛋白在烟草天蛾卵黄体中情况也已有 Van Antwerpen 等（1993）发表过研究报告。

在埃及伊蚊卵母细胞中，Vg 与受体结合以后，即被摄入被膜囊胞。囊胞移到下 1 个区位后形成内吞胞，Vg 与受体分离，整个内吞胞合并成为过渡性卵黄体，在特异性的间隔中，Vg 凝集为晶体，以后又转化为成熟的卵黄体，最后成为晶体 Vn，仍然保留在内吞胞间隔中。

用抗 Vg 的单克隆抗体文库研究伊蚊卵母细胞对 Vg 摄入过程。用抗 Vg 亚单位特异性克隆抗体的双向免疫标记，证明 Vg 的两个亚单位同时以相同的途径摄入卵母细胞，其结果与生物化学方法研究的一致，但缺少摄入过程的前期与末期的材料。

## 5 卵母细胞摄入 Vg 的特征

卵母细胞摄入 Vg 在伊蚊体内已经有过大量研究，它的特征包括以下几个方面：

（1）卵黄蛋白受体位于卵母细胞特异性膜的微域（microdomain）上，该区带有电子不透明的多糖蛋白质复合体（electron-opaque glycocalyx）。在朝向胞质一侧覆盖着包涵素。昆虫卵母细胞膜表面在卵黄发生期具有多种功能，其中之一就是有微绒毛参与形成的被膜囊胞，有些功能则因微域不同而异，如通过滤泡细胞间隙从血淋巴中获得信息联系。

（2）Vg 脱离受体的位置是在内吞胞内。当 Vg 被摄入被膜囊胞，结合到囊胞膜的内侧受体上。Vg 在囊胞内从膜受体结合点上分离。利用离子载体研究发现，配体在卵母细胞内从受体上解离，依赖于 ATP 的磷酸化作用。在惜古比天蚕蛾卵细胞中，离子载体能阻断内吞细胞器中磷酸化的质子梯度，从而抑制 Vg 的细胞内吞。

（3）受体再循环使受体介导的细胞内吞能够连续运转。使用放线酮（cyclohexamide）能抑制蛋白质合成，但不抑制卵母细胞中 Vg 受体的内吞功能。用细胞免疫化学研究伊蚊卵母细胞表明，某些细胞器参与受体的再循环，其中包括细小的微管区和过渡性卵黄体。Vg 不进入微管区，其抗体标记呈阴性。无脊椎动物和脊椎动物一样，具有受体介导的寡聚糖蛋白和 β-磷酸甘露醇配体内吞机制。因此，Vg 的糖基化部位可能成为受体的识别标志。

（4）用 Vg 抗体免疫标记方法，在伊蚊卵母细胞中检测到两种类型的卵黄体，即过渡型与成熟型。前者形成特异性积累区域，它联结含 Vg 的囊胞与微管内吞胞以及无 Vg 的微管区。有人曾经用 Vg 作为特异性蛋白，用辣根过氧化酶作非特异性蛋白研究，表明两种蛋白质进入同 1 个内吞胞，然后与膜的结合点分离。作为非特异性蛋白的辣根过氧化酶的最后结局，依赖于 Vg 的存在与否。在无 Vg 时，辣根过氧化酶和溶酶体融合的蛋白质会逐步崩解；在有 Vg 时，辣根过氧化酶和 Vg 一起首先成为过渡型卵黄体，然后随着蛋白质的积累，辣根过氧化酶被降解，最后转化为成熟型卵黄体。Opresko 等利用生化方法测定，发现爪蟾（*Xenopus laevis*）的卵母细胞在有 Vg 或无 Vg 时，非特异性蛋白都成崩解状态。由此可见，任何与膜结合的蛋白质，都能被摄入到卵母细胞内，但只有 Vg 与受体结合充当转膜信号时，才能刺激积累区域形成卵黄体。家蚕的另 1 种特异性卵黄蛋白在启动卵黄体形成中具有相同的作用。在家蚕的雄虫体内能发育出不完全的 Vg，卵内也存在 ESP 和 30kDa 蛋白的卵黄体，并能达到与雌体中相似的水平。

在伊蚊卵中，卵蛋白酶 VCP 与 Vg/Vn 的内吞过程相似。这种蛋白酶存在于滤胞细胞

周围和卵黄体中，最后围绕在 Vn 晶体的周缘，但彼此是隔离的。

## 6 卵黄体的形成及其性质

在体细胞中，大多数由受体介导的蛋白质被摄入细胞以后，即在溶酶体系统中得到降解。相反，卵黄蛋白被积聚在成熟卵黄体中，要到胚胎发育开始才被降解利用。因此，引起人们去了解摄入后成熟的卵黄蛋白与溶酶体之间的关系，特别是当水解酶进入到卵黄体中以及在胚胎发育过程中被激活时的关系。研究结果表明，蚊子卵母细胞中卵黄体对激活的酸性磷酸酶和其他溶酶体水解酶（芳基硫酸酯酶）反应是阴性的。在卵母细胞发育的中后期，Vn 与水解蛋白质的酶一直是相互分离的。但在一些昆虫中并没有观察到这种现象，只是卵黄体的内切酶没有被活化。埃及伊蚊中 VCP 的酶原（以前称 53kDa 蛋白）被卵母细胞摄入后，沉积在卵黄体中，在胚胎发育时才被激活。又如丝氨酸蛋白酶参与黄猩猩果蝇和家蝇的卵黄降解也是这样。由此可见，在卵黄蛋白中积累的水解酶都是以酶原形式存在的。

在蜚蠊中，Vn 被切除形成结晶，说明蜚蠊卵母细胞中的一些内切酶，较早地被输送到母卵细胞内，并开始酶切卵黄体。但其他昆虫中并不都是切除以后形成晶体。

## 7 影响内吞的因子

卵母细胞发育过程中 Vg 的摄取在致乏库蚊（*Culex fatigans*）、埃及伊蚊、飞蝗、*Nauphreta ciherea*、吸血蝽与惜古比天蚕蛾中已作过详细的研究。由于从某些昆虫体内很难获得足量的 Vg 作为探针，因此研究者大多数利用 Vn 而不用 Vg。研究 Vg 和 Vn 的方法有放射标记碘化作用、$^{3}$H 的还原化、$^{14}$C 的甲基化、$^{3}$H 丙酸盐的标记、$^{32}$P-γ-ATP 的磷酸化以及其他代谢标记等。对放射性标记配体来说，在测定条件下必须具有稳定性、特异性和生物学活性。当用标记方法直接进行比较时，代谢标记的 Vg 或 Vn 以很高的比率积贮，超过一般的碘化作用以及$^{3}$H-丙酸盐或还原性甲基化作用。Vg 或 Vn 在昆虫体内有一个很长的循环过程，但在体内或体外通过代谢获得的 Vg 特异活性标记的比例很低（50～900cpm/μg)。另 1 方法是在脂肪体内合成活性很高时，用$^{35}$S-甲硫氨酸标记的 Vg，可得到较高的特异活性（$3\sim6\times10^{-5}$cpm/μg 蛋白)。

卵母细胞摄取 Vg 具有特异的选择性，其过程受 pH、温度以及二价阳离子浓度的影响。离体培养的昆虫卵母细胞吸取 Vg 的速率依赖于基质的 pH。摄入 Vg 速率最高的 pH 为 6.5～8.0，最小为 6.0，接近 Vg 的等电点（pI)。这是由于降低了 Vg 的溶解度。根据对飞蝗、吸血蝽和埃及伊蚊的观察，4℃ 低温能抑制 Vg 的摄入。

昆虫摄入 Vg 的饱和浓度因昆虫种类不同而异。埃及伊蚊为 21μmol，*N.cinera* 为 80μM，飞蝗、吸血蝽、惜古比天蚕蛾分别为 73μM、45μM 和 30μM。卵母细胞成熟时，Vg 摄入浓度接近饱和，积存量达最大值；相反，在飞蝗和吸血蝽血淋巴中，离体条件下 Vg 的浓度低于血淋巴中卵母细胞的饱和浓度。Vg 摄入率受血淋巴中 Vg 的浓度变化的影响。

在卵母细胞发育时，飞蝗、惜古比天蚕蛾和吸血蝽的 Vg 摄入速率随卵母细胞的变化而变化，在伊蚊中最为明显，在吸血后最初 2h，Vg 的内吞率增加很慢，到第 2 小时末只增加 1 倍，以后 2h 迅速增加到 10 倍，一直延续到吸血后 24h，摄入 Vg 的峰值发生在吸

血后 24～30h，此后急剧下降，到 36h 即停止摄入。

多种抑制剂对卵母细胞摄取 Vg 有抑制作用。离体试验证明，糖酵解和呼吸作用的抑制剂能破坏 Vg 的摄取。在飞蝗中还发现抑制作用存在剂量依赖关系。库蚊和天蚕蛾的 Vg 摄取与能量代谢有关。库蚊中只有糖酵解抑制剂对 Vg 摄入有抑制作用。

钙离子对飞蝗和 *N. cinera* 摄入 Vg 有重要作用。据 Kindle 等报道，少量锶和镁离子可代替钙离子刺激 *N. cinerea* 摄取 Vg，然而钙离子存在时，钡、锶和镁对 Vg 摄取也起抑制作用。此外，还有一些过渡元素，如镍、钴、锌等也有类似的作用，但锰能刺激卵母细胞摄取 Vg。另有报道，钙离子的刺激效果还决定于基质中 Vg 的浓度。

影响离子穿透的药物也对卵母细胞摄入 Vg 产生影响。惜古比天蚕蛾和 *N. cinera* 的离体试验中发现，虽然缬氨霉素（valinomycin）能提高惜古比天蚕蛾中钾的穿透性，但在 50μM 浓度时影响并不明显；在 *N. cinerea* 的滤泡细胞中，10μM 浓度对 Vg 的摄取即产生抑制作用。Kindle 等也发现钙离子阻断剂、verapamil、钾离子通道阻断剂、阿托品和四乙铵抑制 *N. cinerea* 对 Vg 的摄取。试验发现，利用离子通道阻断剂和影响膜渗透性的一价、二价阳离子载体，都对 Vg 摄取有重要作用，它们能影响钙离子的内流。

## 8　其他卵黄蛋白的摄取

### 8.1　小分子量蛋白质

当前对小分子量的非 Vg 蛋白的卵母细胞内在化机制知道得还不多。根据对卵黄蛋白前体进入细胞内贮存的相对动力学研究，发现惜古比天蚕蛾 Vg、LP 和 mVg 等 5 种血淋巴蛋白都由受体介导进行细胞内吞，少量芳香蛋白（arylphorin）和黄素蛋白是以液相摄入卵中的。mVg 在血淋巴中的浓度和 Vg 相似，接近饱和水平。当惜古比天蚕蛾卵黄发生时，两种蛋白质通过不同受体摄入，它们在细胞膜制备物结合位点上或活体摄取时并不发生竞争。埃及伊蚊的卵蛋白羧基肽酶（VCP）也可能有一定的特异性，它以高于非特异性蛋白的速率进入卵母细胞。

### 8.2　载脂蛋白

某些昆虫由囊胞通过载脂蛋白（LP）摄取脂类。鳞翅目昆虫在卵黄发生时，LP 起双重作用。它既是卵黄蛋白的组分之一，又是脂肪体与卵母细胞之间穿梭运送脂类的载体。烟草天蛾卵内的脂蛋白 90% 通过 LDLP 送入卵巢，但 LDLP 本身并不进入卵母细胞，而反复进行穿梭运输，其余 10% 的脂随 HDLP 与 Vg 一起进入卵母细胞。雌成虫血淋巴中的 HDLP 也被摄入囊胞而水解为脱辅基蛋白（apoprotein）。进入囊胞的与 HDLP 结合的脂大多数又从蛋白颗粒上被除去，接着两个脱辅基脂蛋白 apoLpⅢ分子从 HDLP 上分离出来转化为 VHDLP。

在惜古比天蚕蛾中，HDLP 在卵母细胞中转化为 VHDLP，不转化为 apoLpⅢ分子，因此增加了血淋巴载脂能力，但不进入囊胞。从观察到的现象产生两个问题，首先是惜古比天蚕蛾的 apoLpⅢ的命运，其次是它脱离卵母细胞表面的方式。估计它离开细胞表面与 HDLP 分离后进入血淋巴中。惜古比天蚕蛾的 HDLP 在受体介导过程中，通过内吞进入囊

胞，其机制与烟草天蛾不同。据 Osir 与 Law 测定，在烟草天蛾中载脂蛋白并不与受体产生竞争性结合。Kawooga 等指出离体培养的囊胞摄取 HDLP 不受培养基中过量的 Vg 的影响，说明烟草天蛾的 HDLP 与 Vg 通过不同受体被卵母细胞内吞。

## 第四节 卵黄发生的激素调控

在昆虫体内有两种调节生长发育的激素，即保幼激素（JH）和 20 羟基蜕皮酮（20HE）。它们在雌成虫卵黄发生时起到调控性腺的作用。同时脑产生的神经激素也对卵黄发生起调节作用。JH 和 20HE 的调节作用因昆虫种类不同而异。

### 1 Vg 合成的调控

家蚕的卵黄原蛋白积聚在幼虫化蛹时的血淋巴中，与其他昆虫有些不同，当时卵黄原蛋白含量较低，只占血淋巴总蛋白的一小部分。通过脂肪体 RNA 与 cDNA 探针作诺森杂交印迹分析，在吐丝期第 2 天首先出现 Vg mRNA，到幼虫化蛹蜕皮时达到最高值，此后便逐步下降。在雄虫脂肪体和雌虫卵巢中，没有测到 VgmRNA 的痕迹。用内含子标记探针的诺森杂交，发现家蚕卵黄原蛋白的合成存在虫期、性别和组织特异性，在基因转录水平上受到激素的调控。

Vg 合成的启动，不同种类之间有很大的差异。在蛾类中按成虫补充营养不同分为 3 类：①成虫不取食的在末龄幼虫进入预蛹或蛹初期开始；②成虫取食的在预成虫期开始；③成虫取食的到成虫期才启动。以上 3 类都受 JH 和 20-羟基蜕皮酮的调控。

在飞蝗体内，JH 是卵黄原蛋白的主要诱导者。雌成虫中若摘除咽侧体，便抑制卵黄蛋白（Vn）的产生，JH 或类似物烯虫酯（methoprene）处理以后，能使去咽侧体的雌虫重新合成 Vg。然而尽管血淋巴中含有高水平的 JH，却不能促使雄性成虫或两性幼虫合成卵黄原蛋白。在幼虫体内只有使用大量的 JH 处理，才能导致卵黄原蛋白的合成；对雄成虫来说，即使用相同的大剂量 JH 处理，也不会产生反应。这些结果表明，在变态过程中，性别限制性程序抑制着雄性成虫 Vg 基因的活化。

对大多数昆虫种类来说，JH 是调控卵黄发生的关键。在卵黄发生前期，JH 促使昆虫脂肪体在蛹—成虫的变态期转型，产生出促进 Vg 合成的能力，同时又作用于卵母细胞，使它摄取 Vg；在卵黄发生期，JH 启动脂肪体内合成 Vg，并提高脂肪体对蜕皮激素的反应。

昆虫激素对家蚕卵黄原蛋白的合成诱导作用仍有一些不清楚的地方。主要是由于这些昆虫体内卵黄原蛋白的合成和幼虫化蛹的蜕皮相伴发生，将蜕皮甾醇加入到离体培养的幼虫脂肪体中，能够刺激蛋白质的合成，然而这种影响并不是专对卵黄原蛋白的。JH 作为卵黄发生的诱导者，也有一些疑问，因为去咽侧体不能阻止预蛹的卵巢成熟，也不阻止卵黄原蛋白的合成。

30kDa 蛋白的生物合成也是在激素调控下进行的。家蚕血淋巴中 JH 的浓度直到 4 龄幼虫末期一直保持在阈值以上，到 5 龄初才迅速下降。血淋巴中蜕皮甾醇在幼虫发育期滴度很低，到每龄幼虫蜕皮时才上升。在幼虫到蛹的变态时，其滴度达到最大值。30kDa 蛋白基因的活化显然由血淋巴中 JH 的消失所触发的。在倒数第 4 龄幼虫中，除去咽侧体，

立即会引起脂肪体内 30kDa 蛋白 mRNA 水平的上升。

## 2 对滤泡细胞的调控

JH 对卵黄发生的调节作用有下列 3 个方面：终端滤泡细胞的生长；滤泡细胞的分化；卵母细胞对蛋白质的摄入与内在化。

JH 对滤泡细胞的调节作用表现在细胞之间的分离与孔隙的出现。JH 还影响到细胞膜的钠/钾 ATP 酶。Vg 可与钠/钾 ATP 酶复合物中的 1 个肽链相结合。Henchuk 等（1987）和 Davey（1985）认为这种肽本身可能就是 JH 在滤泡膜上的受体。在长红猎蝽中，将 JH 加入到滤泡培养液中，并不改变代表配体结合位点的结合常数，而代表 Vg 结合位点的饱和值增加，表明 JH 是通过增加 Vg 的结合位点来提高 Vg 的结合能力（Wang 等 1992）。在埃及伊蚊中，内吞复合体的产生受 JH 的调控，Vg 摄取速度在卵黄发生起动后 20h 内依赖于一个脑因子，而 20HE 也同样能促进 Vg 的摄取，Sevala 与 Darey 发现，JH 对滤泡细胞膜的作用还受到蛋白激酶 C 的调控，使钠/钾 ATP 酶的 1 个亚单位 $100\times10^3$u 肽磷酸化。飞蝗滤泡细胞之间的分离存在一个 JHⅢ 的作用阈值，大约为 $1\times10^{-12}$M，最大值为 $5\times10^{-7}$M。吸血蝽的滤泡细胞的分离可被乌本苷（ouabain）抑制，这也说明了其中存在钠/钾 ATP 酶的作用。

## 3 卵母细胞摄入的调控

激素对 Vg 的内吞速率的影响因昆虫之间种类不同而异。Lavedure 报道，黄粉甲的卵巢培养在没有 JH 的试液中，能够摄取 Vg，这从高尔基体的液相胞吞作用中得到证明。用辣根过氧化酶测试，JH 类似物 methopren 启动卵母细胞的摄入，随着激素量的增加，摄入速率与随之增高。Rockastein 和 Ferenz 也发现 methoprene 对飞蝗有相似的作用，但对 *N.cinerea* 则没有这种效应。后来又有人在惜古比天蚕蛾中发现这种现象。因此，认为是培养液中脑因子所起的作用。这与在蛙类卵母细胞中发现胰岛素（insulin）和绒膜促性腺激素（chorionic gonadotropin）促进卵母细胞摄入有相似的效应。但还有许多机制尚未搞清。在蚊虫体内有人认为 20HE 增加 Vg 的吸人速率也需要脑因子的作用。此后这种脑因素被认定为卵发育神经激素（egg development neurohormme，EDNH）。

## 4 卵黄原蛋白合成的调控模式

根据 Vg 的合成方式，可以将激素调控机制分成 3 类。

（1）在飞蝗、吸血蝽和蜚蠊等半变态昆虫中，JH 是调控 Vg 唯一的激素。

（2）双翅目昆虫由 JH 和 20HE 共同控制 Vg 的合成。在蚊子和果蝇中，20HE 对 Vg 的合成速率有重要作用。

（3）鳞翅目昆虫在预成虫或蜕皮后，Vg 的发生受 JH 和 20HE 的启动。

### 4.1 直翅目

Chen 等（1978）报道，蝗虫的 Vg 在血淋巴中最早出现于成虫蜕皮后的 8d，在蜕皮后 13d 达到峰值，至 18～24d 开始下降，其后 Vg 随着卵巢的发育周期而波动。Chen

(1981) 又提出 Vg 合成依赖于 JH。JH 刺激脂肪体的 Vg 合成具有较高的选择性，并和性别及发育期有关。在脂肪体中，VgmRNA 和 Vg 滴度同时达到高峰值。在体内 Vg 滴度下降时，脂肪体内总 RNA 同时下降，而 VgmRNA 亦有所下降（Reid & Chen，1981）。缺乏 JH 的蝗虫在第 1 次用 JH 刺激后，其 VgmRNA、Vg 核糖体及 Vg 的合成经延搁期后才开始迅速增加。在 JH 第 1 次刺激时，延搁期内先使脂肪体增殖内质网和 VgmRNA，第 2 次刺激则使 Vg 基因进行专一性表达（Wyatt 等，1981）。飞蝗的 VgA 和 VgB 基因分别有 12kb 和 10.5kb，后由 Locke 等（1987）进行了克隆。这 2 个基因均位于 X 染色体上，它们除 5’端外，编码区 DNA 不互相杂交。在 2 个基因的上游有几小段核苷酸序列明显相似，很可能是 JH 调控单元。

### 4.2 鞘翅目

龚和等（1982）报道，七星瓢虫（*Coccinella septempunctata*）Vg 合成受 JH 的调节，JH 能有效激活 Vg 基因；Vg 也受食物因子的刺激。在取食人工代饲料时，瓢虫合成 Vg 的速率及 VgmRNA 的活性都比较低，当用烯虫酯分别处理取食蚜虫及人工代饲料的瓢虫时，Vg 的滴度提高，脂肪体中 Vg 的合成量增加，从烯虫酯对取食人工代饲料的促进作用，说明取食人工代饲料的瓢虫内源性 JH 水平较低，因而对外源性 JH 有很大的依赖性。

### 4.3 鳞翅目

鳞翅目昆虫 Vg 的合成大多受 JH 和 20HE 的调控，调控方式因种类不同而异。惜古比天蚕蛾和家蚕成虫不取食，从预蛹期开始进人变态阶段，JH 滴度下降时，Vg 合成得到启动，而 20HE 激发它的合成。烟草天蛾成虫需要补充营养，Vg 合成开始于蛹期，并不依赖于 JH，只有在羽化后卵母细胞发育时才需要 JH。谷实夜蛾和黏虫等也是成虫取食的，羽化后开始合成 Vg，只依赖于 JH 而与 20HE 无关。

### 4.4 双翅目

在家蝇体内，20HE 首先影响脂肪体的形态变化及卵母细胞的前期发育。卵发育神经激素（egg development neurohormme，EDNH）、JH 和 20HE 对 Vg 合成的起动和维持都是必需的。JH 提高脂肪体对 20HE 的敏感性，同时促使卵巢发育进人卵黄发生期，在卵黄发生启动后，20HE 诱导和维持脂肪体中 Vg 的合成。说明 JH 与 20HE 具协同效果。另外也发现胸部神经节产生的抑卵激素控制卵巢的周期性发育。

家蝇 Vg 基因的表达除了有性别、组织和时间的特异性以外，营养也是卵巢成熟的一个重要因子。取食蛋白的雌虫能使卵巢成熟，而取食蔗糖的则不能。

在埃及伊蚊中，羽化激发卵巢发育，但卵母细胞只发育到体止期，吸血后才使进入卵黄发生期。直到卵的成熟，它的 Vg 合成受 JH 和 20HE 的共同调控。JH 诱导脂肪体对 20HE 的应答能力。20HE 可以诱导不吸血、去卵巢或颈部结扎的伊蚊脂肪体合成 Vg（包括离体的脂肪体）。蚊子的 20HE 也受 EDNH 的控制。EDNH 通过 cAMP 作用于卵巢，同时本身又依赖子 EDNH 释放因子的刺激。释放因子是一类苯丙氨酸—甲硫氨酸—精氨酸—苯丙氨酸末端的多肽。

# 第五节　卵蛋白酶与卵黄蛋白的降解

卵黄蛋白的降解和利用受到卵内蛋白酶有程序地调控。因此，蛋白酶对胚胎发育的启动及其进程具有十分重要的意义。自从 Kukmein1966 年开始研究蝗虫的卵黄蛋白酶以来，已有 10 余种昆虫卵内蛋白酶得到了提纯和定性，并且测定了氨基酸序列，其中以家蚕的卵蛋白酶研究最详尽。

## 1　昆虫卵蛋白酶的种类

已经研究过卵蛋白酶的昆虫有蝗虫（MacGregor & Loughton 1977）、果蝇（Rownes & Hames，1977，Medina et al，1988）、家蚕（Kageyama & Takahashi 等，1981～1993）、美洲大蠊（Storella，1985）。在我国，赵小凡等对家蚕、蓖麻蚕、柞蚕和棉铃虫卵内的蛋白质与蛋白酶的比较研究做了大量工作。

各种昆虫的卵蛋白酶作为内肽酶，根据活性中心催化的残基，可以分为 4 类，即：

（1）丝氨酸蛋白酶（serine proteinases）。

（2）半胱氨酸蛋白酶（cysteine protcinases）。

（3）天冬氨酸蛋白酶（aspatic proteinases）。

（4）金属蛋白酶（metallo proteinases）。

在上述蛋白酶中又可分为若干种次一级的蛋白酶。例如，在家蚕卵内就存在 3 种丝氨酸蛋白酶，在埃及伊蚊中检测到丝氨酸羧肽酶（Choetal，1991）。此外，尚有一些催化机制不明的蛋白酶（表 10-4）。

**表 10-4　昆虫的卵蛋白酶**

| 虫种 | 酶的种类 | 基质 | 分子量（$1\times10^3$u）<br>亚单位/全量 | pH | 合成部位 | 贮存时期和部位 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 家蚕 | 关胱氨酸蛋白酶（类组织蛋白酶 L） | Vn<br>ESP | 47/350 | 3.5 | 滤泡细胞 | 贮存在卵黄颗粒中 |
| 家蚕 | 丝氨酸蛋白酶（ESP-蛋白酶） | ESP | 30.5<br>29/— | 8.0 | 卵母细胞 | 胚胎发生后期（家蚕胚胎发育第 8d 最高） |
| 家蚕 | 丝氨酸蛋白酶（30kDa 蛋白酶，胰蛋白酶类） | Vn<br>ESP<br>酪蛋白 | 30/— | — | 卵母细胞 | 胚胎发生后期（家蚕胚胎发育 7～8d 以后） |
| 家蚕 | 丝氨酸蛋白酶（24kDa 蛋白酶） | Vn<br>ESP<br>酪蛋白 | 24/— | — | 卵母细胞 | |
| 埃及伊蚊 | 丝氨酸蛋白酶，羧基肽酶（VCP） | — | 53（非活性）<br>48（活性） | — | 脂肪体 | 贮存于成熟卵中 |
| 埃及伊蚊 | 卵黄蛋白硫基酶，组织蛋白酶 B（VTP） | — | 44/— | — | 脂肪体 | — |
| 蓖麻蚕 | 半胱氨酸蛋白酶 | — | 47/158 | 5 | | |
| 蓖麻蚕 | 大冬氨酸蛋白酶 | — | 90/360 | 4 | | |
| 柞蚕 | 半胱氨酸蛋白酶（类组织蛋白酶 B） | — | 47/— | 3.5 | | |
| 棉铃虫 | 半胱氨酸蛋白酶 | — | 30/60 | 3.0～4.0 | | |

根据山本芳实和赵小凡资料汇编

## 1.1 半胱氨酸蛋白酶

Kageyama 和 Takahashi 等以不同的 pH 值对家蚕卵中进行提取，将提取物温育以后，用 SDS 电泳，在 pH3～4 附近获得 3 种分辨率相当高的蛋白酶。E-64 特异性抑制剂对该酶有强烈的抑制作用，由此鉴定出该酶属半胱氨酸蛋白酶类，命名为家蚕半胱氨酸蛋白酶（bombyx cysteine proteinase，BCP）。它的性质见表 10-5。

从家蚕成熟卵中分 5 步提取卵蛋白酶，100g 卵可得到 2～3mg 的精制品。说明该酶在卵内的量较多，每个卵巢中达到30$\mu$g。凝胶过滤得到的天然物的酶分子量为$350\times10^3$u，

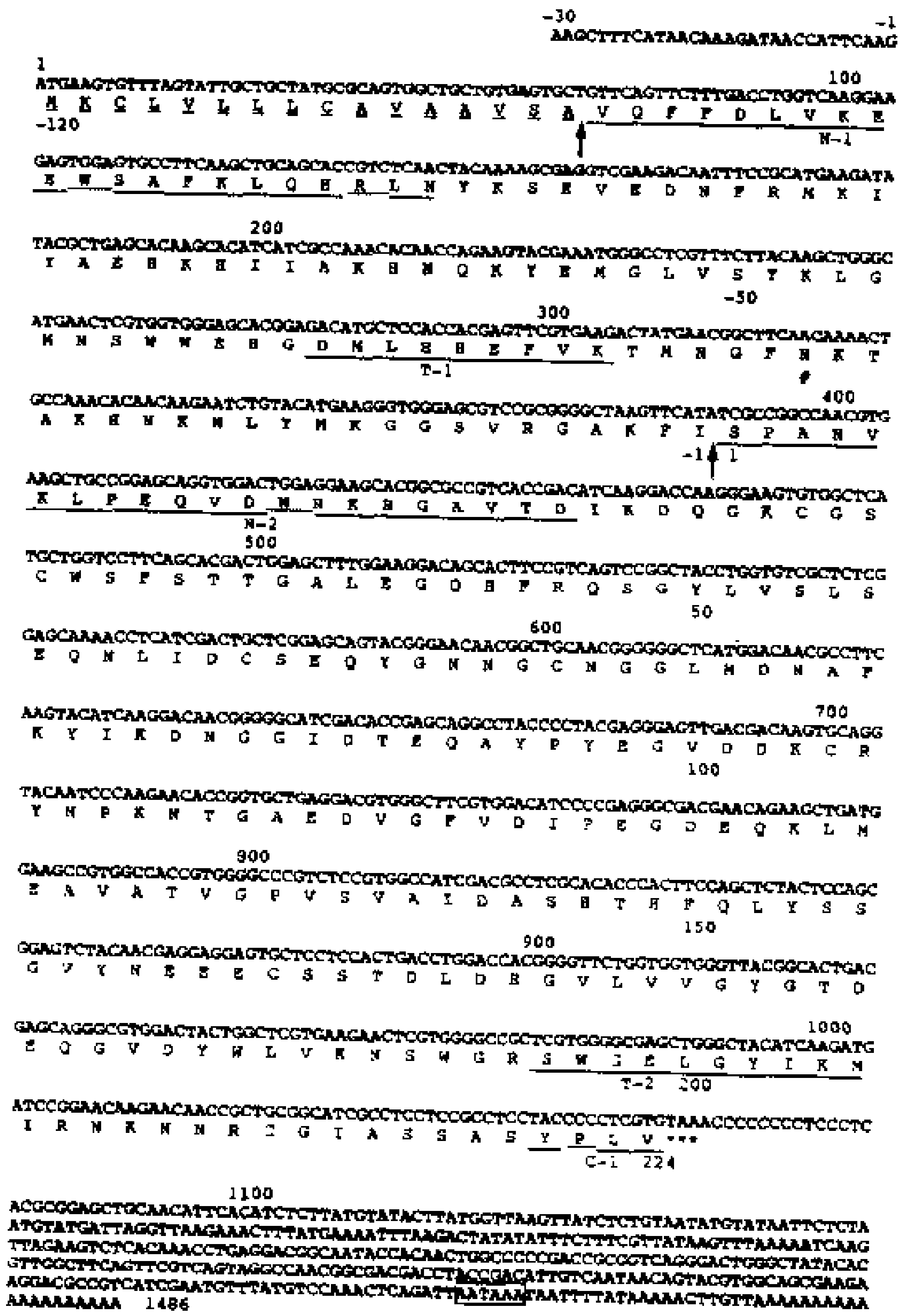


图 10-7 家蚕半胱氨酸蛋白酶氨基酸序列

N-1 为无活性前体物的氨基酸末端序列 N-2 为成熟型氨基酸末端序列

C-1 为成熟型的羧基末端序列 ★为糖基结合部位 ↑示原酶向成熟型过渡的酶切位点

（仿山本芳实，1995）

表 10-5　家蚕的半胱氨酸蛋白酶

| | |
|---|---|
| 分子量 | 凝胶过滤　$350\times10^5$u<br>SDS-PAGE　$47\times10^3$u（无活性前体）　$39\times10^3$u（活性成熟型） |
| 基质特异性 | 血红蛋白（100）＞酪蛋白（63）＞球蛋白（51）＞牛血清蛋白（28）＞细胞色素（18）＞卵巢 A（8）<br>Vn（61）＞ESP（60）＞Vg（55）＞LP（21）＞30kDa 蛋白（8）<br>Z-Phe-Arg-MCA（250）＞Z-Arg-Arg-MCA（1） |
| 最适 PH | 3.5 |
| 抑制剂 | 无（100）、吲哚-3-乙酸（1AA）（6）、对氯甲基苯甲酸（PCMB）（67）、DTNB（19）、NEM（20）、Chymostatin（3）、Antipain（23）、TLCK（3）、TPCK（8）、E64（1）、Z-Phe-Phe-$CHN_2$（1）、EDTA（144）、Phosphoramidon（108）、Pepstation（98） |

（录自山本芳实，1995）

精制的酶通过电泳得到 $47\times10^3$u 的单一肽，全酶由 8 个亚单位构成同质聚合物。对血红蛋白、酪蛋白有分解活性；对卵内蛋白质 Vn 与 ESP 都有很高的活性。BCP 对 pH 有很大的依赖性，当 pH3.5 时，可使酶在卵内局部活化；但对 30kDa 蛋白的分解能力很弱。从基质的特异性可以看到 BCP 在胚胎发育时具有明显的专一性和时空调节作用。从氨基酸末端序列、酶切位点等特征表明，它和哺乳动物的溶酶体半胱氨酸蛋白酶（组织蛋白酶 B、H 和 L 等）有很大的相似性（图 10-7）。此外，两者的抑制剂也是相同的，特别与组织蛋白酶 L 有更多的相似性，因此，又称 BCP 为类组织蛋白酶 L（pathepsin L-like）。

### 1.1.1　酶的结构

山本等用家蚕半胱氨酸蛋白酶（BCP）的抗血清从家蚕卵巢 cDNA 文库中对该酶克隆获得成功，并测定了 BCP 全基因的序列。氨基酸末端与胰蛋白酶分解肽比较，它们之间有很大的一致性。在转译区中有 344 个氨基酸和富疏水性的 16 个残基的信号肽、104 个残基的原区以及 224 个残基的成熟型酶区。BCP 属糖蛋白性质，原区中有 1 个糖链结合部位。有趣的是在成熟型酶区与动物组织蛋白酶 L、木瓜蛋白酶 L、种子发芽时水解蛋白质的 aleurain 和 oryzain 等有很大的相似性。BCP 成熟型（M 型）的氨基酸末端比组织蛋白酶 L、B 等长 6 个氨基酸残基。在原区内与各种半胱氨酸蛋白酶之间的相似性较少，但仍有一些共同点。另外，Karrer 提出几个蛋白酶中具有 ERFNIN〔$EX_3RX_2$（I/V）$FX_2NX_3IX_3N$〕主题。BCP 有 2 段序列存在差异。由于 1 个碱基被置换，产生氨基酸的变异是组织蛋白酶 L 酶系的特征，其他区域中保持良好的稳定性。通过 X 射线晶体解析，与成熟的组织蛋白酶 B 和木瓜蛋白酶的主体结构有相似性，它们的氨基末端附近的活性基半胱氨酸（25）的-SH 和羧基末端附近的组氨酸（159）的咪唑-NH 的主体构造相同，在与基质结合的“袋子”中，形成电荷转换的切断器，氨基末端和羧基末端的 2 个区域，形成“袋子”的类型和电荷，从而产生基质特异性。在 BCP 中保存了半胱氨酸和组氨酸，因而具有木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 L 相同的 2 个原区。

### 1.1.2　生物合成和组织定位

用特异性抗体进行测定，结果表明家蚕化蛹后第 5～6d 半胱氨酸蛋白酶的活性急剧上升，并开始积累，其进程与卵的成熟相一致。在成熟卵巢的切片中，用组织免疫化学分析，观察蛋白酶在卵内的分布，发现在卵巢发育第 3d，卵细胞中已开始大量选择性摄取

Vn，分布在卵黄颗粒中的 BCP，随卵的成熟和基质 Vn 与 ESP 的积累也相应地得到积累。至 6d BCP 的积聚终止。

半胱氨酸蛋白酶不像有些蛋白酶，先在脂肪体内合成，然后分泌进入血淋巴，再由卵细胞摄取，而是在滤泡细胞内合成的（在滤泡细胞中可分离到该蛋白酶）。在成熟的卵巢中，可以得到具翻译活性的 mRNA，施用卵巢摘除术（ovariectomy）以后，血淋巴中积贮大量的 BCP；在摘除一半卵巢的个体中，积贮量也减少一半，说明 BCP 由滤泡细胞合成，通过血淋巴再供应卵巢（表 10-6）。

**表 10-6 摘除卵巢的家蚕中 BCP 的含量**

（山本芳实，1995）

| 血淋巴中 BCP 活性（mU/μl 血淋巴） | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 虫龄 | 雄 | 雌 | 摘除一半卵巢 | 摘除全部卵巢 |
| 5d 蛹 | 32±5.0 | 100±5.0 | | |
| 6d 蛹 | 60±4.0 | 37±1.2 | 72±7.3 | 300±10.1 |
| 卵巢中 BCP 活性（U/mg 蛋白质） | | | | |
| 虫龄 | 卵巢 | | 移入卵巢的雄虫 | |
| 5d 蛹 | 432 | | | |
| 6d 蛹 | 770 | | 800 | |
| 7d 蛹 | | | 1 700 | |

蜕皮后的 5d 幼虫摘除卵巢，移植到雄幼虫体内，化蛹后测定。用 Z-Phe-Arg-MCM 作 BCP 的底物。mU/μl 为血淋巴中的活性单位（录自山本芳实）

赵小凡等用家蚕蛹组织提取液，测定半胱氨酸蛋白酶的活性，结果发现卵巢中酶的活性很高，在雌雄血淋巴和脂肪体中活性很低。其中半胱氨酸蛋白酶占卵巢中总蛋白的酶活性的 60%。为了进一步确定卵巢中蛋白酶是由滤泡细胞合成的，进行了免疫学组织化学定位。卵黄发生前的卵巢与抗半胱氨酸蛋白酶血清温育，结果在卵母细胞周围显示强染色，但滤泡细胞和营养细胞不着色，卵黄发生前的卵巢也没有明显着色，只有进入卵黄发生期的卵巢和抗血清温育时，才见到卵黄颗粒和滤泡细胞被染色。说明滤泡细胞在这一时期开始合成半胱氨酸蛋白酶。BCP 作为一种蛋白质是与卵黄原蛋白一起进入卵母细胞的。卵巢或血淋巴（去血细胞）中的 BCP 属前体型，但在精巢中却存在成熟型，两者的比例为1∶1。

### 1.1.3 鳞翅目昆虫半胱氨酸蛋白酶的比较

据赵小凡等（1996）报道，家蚕卵中半胱氨酸蛋白酶为类组织蛋白酶 L，由滤泡细胞合成，以酶原形式贮在卵黄颗粒中，在胚胎发育开始后通过自身降解活化，亚基分子量 $47\times10^3$u，全酶分子量 $360\times10^3$u，为八聚体结构。蓖麻蚕和柞蚕卵内半胱氨酸蛋白酶为类组织蛋白酶 B，亚单位分子量与家蚕的相同，但蓖麻蚕全酶分子量仅 $158\times10^3$u，为四聚体结构。棉铃虫卵内的半胱氨酸蛋白酶活性很高，并对高温有一定的耐受力。亚单位分子量 $30\times10^3$u，全酶分子量 $60\times10^3$u，属二聚体结构。

## 1.2 丝氨酸羧基肽酶

丝氨酸羧基肽酶（seryl carboxypeptidsae）的资料来自 Cho 等（1991）对埃及伊蚊的研究。该酶在脂肪体内合成前体物后转移到卵母细胞中。已经克隆了 cDNA 编码的蚊子卵

黄蛋白羧基肽酶（VCP），同时确定了它的序列。特异性 mRNA 只在卵黄发生的雌虫脂肪体中表达。根据 VCP 氨基酸序列，推断该族成员之间有明显的同源性。VCP 在胚胎发生时被活化，与 $53\times10^3$u（酶原）到 $48\times10^3$u（活化酶）的转化有一定的联系。活化型的高峰期出现在胚胎发育的中期，到胚胎发育结束时消失。

### 1.3 天冬氨酸蛋白酶

赵小凡等（1996）报道，在蓖麻蚕卵中存在天冬氨酸蛋白酶（aspartic proteinase）。蓖麻蚕卵蛋白酶在纯化以后，经 DEAE-Toyoprarl 层析，获得天然分子量 $360\times10^3$u 的天冬氨酸蛋白酶，亚单位分子量 $90\times10^3$u，推测全酶由 4 个亚单位组成。特异性抑制剂 pepstatin 对该酶有强烈的抑制作用。在 pH3.0～5.0 条件下均可水解牛血红蛋白，但在 pH4.0 时水解率较高。在离体试验中可水解 Vn，与组织蛋白酶 D 有相似的特点。此外，在柞蚕和棉铃虫卵内也发现有天冬氨酸蛋白酶。在柞蚕卵母细胞内，天冬氨酸蛋白酶对半胱氨酸蛋白酶可能具有活化作用。

### 1.4 丝氨酸蛋白酶

丝氨酸蛋白酶（serine proteinases）中研究得较多的属 SEP 特异性蛋白酶。该酶能高度专一地降解卵黄特异性蛋白，而不能降解其他卵黄蛋白（Indrasith 等，1988，Yamashita & Indrasith，1988）。全酶由 $30.5\times10^3$u 与 $29\times10^3$u 两个亚单位组成。在精氨酸与赖氨酸残基羰键上水解基质。DEP、PMSE 和 leupeptin 对该酶有很强的抑制作用，因此属丝氨酸蛋白酶。以完整的 ESP 作为基质，可初步分解出 3 个片段，说明 ESP 在两个位点上被蛋白酶切除。酶的活性在家蚕胚胎发育早期很低，直到第 4d 活性才急剧增加，第 8d 达到最高峰，同时蛋白酶的 mRNA 也明显增加。说明酶活性的增加依赖酶蛋白的合成。

在家蚕卵内还有两种特异性磷蛋白酶（vitellin-specific protease），分子量分别为 $34\times10^3$u 和 $24\times10^3$u，也属丝氨酸蛋白酶类型。这些蛋白酶 cDNA 已被克隆，主要结构也是通过测定 cDNA 序列获得的。序列中有 264 个氨基酸残基，与类胰蛋白酶中丝氨酸蛋白酶有高度的同源性。两种酶均能切除 Vn 与 ESP 成为几种小肽，但不水解 30kDa 蛋白，主要作用是在胚胎内降解蛋白质，使 Vn 参与幼虫组织分化和形成。对基质的重链（VH）有高度专一性，而不降解 $42\times10^3$u 的轻链（VL）。这些蛋白酶在胚胎中的出现虽与胚胎蛋白质降解的启动有密切关系，但两种酶存在不同的功能。从发育卵中 RNA 制备品诺森印迹分析表明，在离体试验转录系统中 mRNA 产生一个 $32\times10^3$u 多肽，原始转译产品表达出两个成熟型蛋白酶。说明这两种蛋白酶是单基因产品，在 Vn 的量开始下降时（胚胎发育 7.5d）突然出现，也说明与 mRNA 的出现和积累有关。

## 2 卵蛋白酶的活化

当 BCP 和其他蛋白酶的前体物在脂肪体或滤泡细胞中合成以后，积蓄在卵母细胞内，在胚胎发育时必须经过活化，才具有分解卵黄蛋白的活力。根据 SDS-PAGE 的电泳结果，$47\times10^3$u 的非活性前体物，经过 2 个中间型（X、Y）才能变成为 $39\times10^3$u 的活性型。在

此过程中，39×10$^3$u已失去糖链，成为比较稳定的成熟型（M型）。M型的氨基酸末端序列用Edman分析表明，有6个氨基酸残基的长度，缺少组织蛋白酶L中常见的羧基末端的加工过程，与溶酶体中成熟型组织蛋白酶相比有很大差别，而与木瓜蛋白酶相似，由此判断BCP的活性机制如图10-8所示。

从图10 8中可看到，前体型的最适pH为4.25，能被E64完全抑制，其过程属自动催化反应（autocatalytic reaction），其中又分为分子内与分子间两种。活化型的出现时间与酶浓度无关。另外，在分子间反应时，既使酶浓度十分低下，只要在酸性条件也能起到活化作用。由此可见，从酶原型到活化型的转换是酸性条件下自动催化的分子内反应。根据这一模式，转变过程中出现了X、Y两个中间型。受精卵中BCP的原型，在胚胎发育时经过中间型而逐渐成为成熟型。在离体试验时，遇酸性条件，卵黄颗粒中同样出现这种转变，证实了由P到X、Y最终成为M型模式的存在。

另据赵小凡等报道，钙离子对半胱氨酸蛋白酶有激活的作用。

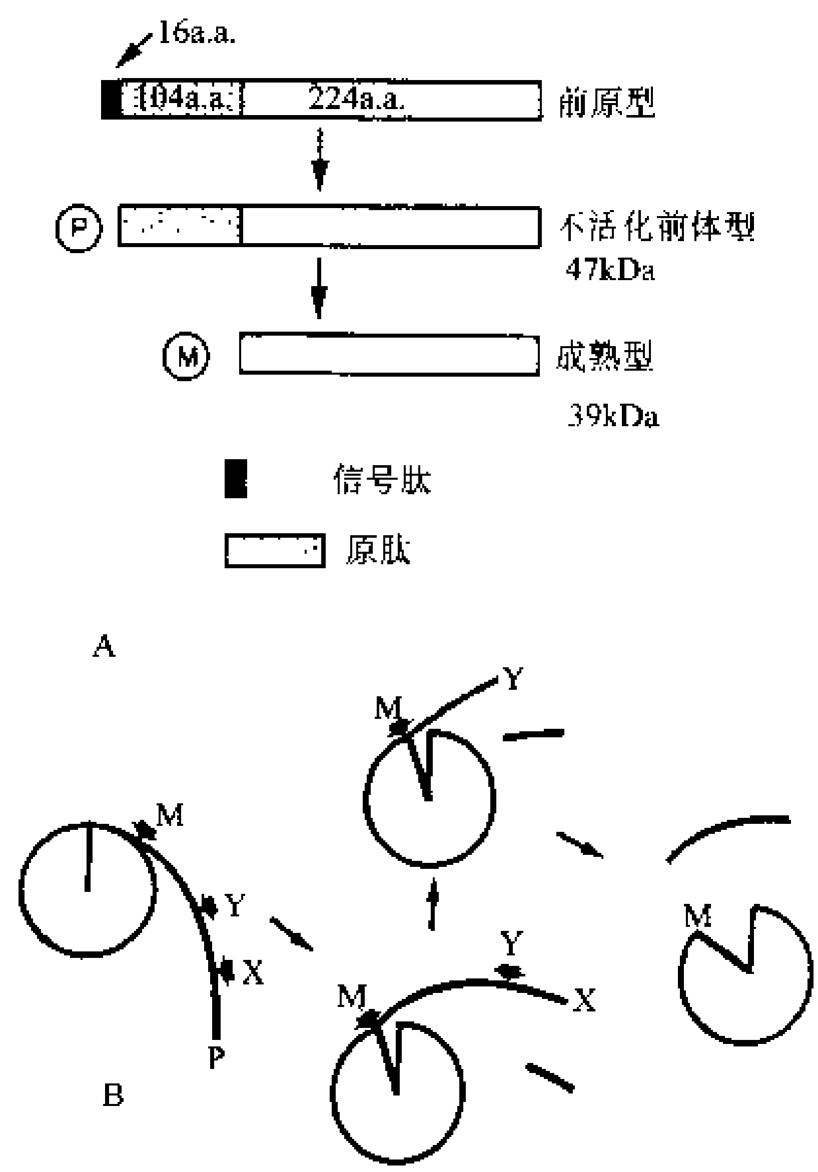



图10-8 家蚕半胱氨酸蛋白酶活化过程
A. 从前原型到成熟型 B. 酶切过程
P. 不活化前体型（47u×10$^3$） X. 中间型（44u×10$^3$）
Y. 中间型（41u×10$^3$） M. 成熟型（39u×10$^3$）
↑. 示酶切处
（仿山本芳实，1995）

## 3 卵黄蛋白降解的调控

胚胎发生时，卵黄蛋白被降解，经过酶切和水解，成为许多较小的组分，直至产生氨基酸为胚胎发育所利用。家蚕的3种卵黄蛋白质（Vn、ESP和30kDa蛋白）在胚胎发育时以不同步骤进行降解，其他昆虫也以同样方式对卵内蛋白质进行有序降解。降解过程包含着蛋白酶的特异性识别和酶原活化等一系列调控机制。这是当今生命活动中十分受人重视的研究课题。

### 3.1 调控方式

蛋白酶在降解卵黄蛋白时，按下列几种方式进行有序降解。

（1）特异性蛋白酶的降解作用。这使一些蛋白被降解而不影响其他蛋白的保存。如血管紧张素（angiotensin）受血管紧张肽原酶（renin）的作用。在胚胎发育时特异性卵黄蛋白酶对特异性卵黄蛋白（ESP）的水解也是一例。大多数昆虫的半胱氨酸蛋白酶以酶原形式贮存在卵黄颗粒中。组织蛋白酶属无活性的L型和B型前体，贮存在卵黄颗粒中，胚

胎发育时经过自动催化使L型活化，但B型需要组织蛋白酶D等酶类的催化。

(2) 蛋白酶与基质蛋白的空间定位分隔。溶酶体中的蛋白酶被局限在液胞中。在卵黄蛋白颗粒中，VCP和VTP仅存在于含Vn的卵黄体的周围间隙中。

(3) 蛋白酶活性的调节作用。未活化的酶原通过限制性活化因子或抑制因子进行调控。例如cystatin对半胱氨酸蛋白酶有抑制作用，而钙离子可以促进蛋白酶的活化。

(4) 基质蛋白修饰的调节作用。蛋白酶分解基质蛋白时，酶切位点必须是暴露的，才能与酶相互作用，磷酸化作用也是如此。家蚕卵内蛋白中的激酶在胚胎发生同时使Vn磷酸化，经过磷酸化的Vn对BCP具有很高的敏感性。此外，蛋白质疏水性的变化，限制性分解引起的蛋白质变构以及基质的硫化等各种修饰作用，都可影响卵黄蛋白的降解。蛋白颗粒酸化引起的酶原活化机制在螨类、果蝇和海胆中都有报道。

(5) 蛋白酶合成的时序性。在家蚕胚胎发育后期，生物合成数种胰蛋白酶类，与活化后的半胱氨酸酶一起，降解蛋白质。

对30kDa蛋白的降解作用迄今还有一些机制没有搞清。在卵孵前尚可测到许多30kDa蛋白的残余，这些剩余的多肽能为初孵幼虫提供营养，届时可能有幼虫的胃蛋白酶承担消化作用。

## 3.2 卵黄蛋白的磷酸化和脱磷酸化作用

磷酸化与脱磷酸化作用在卵黄蛋白的降解过程中起调节基质蛋白酶对基质的敏感性的作用。从后翻译修饰或钙离子结合以及辅助因子的作用来看，基质的磷酸化或脱磷酸化至关重要。脊椎动物的卵黄蛋白含磷量很高；相反，在昆虫的卵黄原蛋白中只含少量与丝氨酸结合的磷。磷酸化发生于后修饰过程中，这是昆虫纲卵黄蛋白的共同特点。在家蚕中，磷酸化发生在胚胎发生期。$^{32}P$注射到未受精或滞育的卵中，放射活性出现在ESP上，其他蛋白则是非磷酸化的。将$^{32}P$注射到正在发育的卵内（产后2d），它可以与多种蛋白质结合而产生磷酸化，在Vn的亚单位上磷酸化的程度最明显。不同性质的蛋白质磷酸化作用也不完全相同。卵黄原蛋白磷酸化依赖于cGMP的蛋白激酶（G-激酶），它们之间在卵发育的早期是同步出现的，直到胚胎发育后期，激酶水平才开始下降。Vn是激酶的最适基质之一，因此Vn的磷酸化非常明显。当G-激酶使Vn充分磷酸化时，半胱氨酸蛋白酶的降解速率也大大提高。从另一方也可看出，半胱氨酸蛋白酶对磷酸化的Vn的Km值低于非磷酸化的，由此得出这样的结论：Vn的磷酸化是家蚕卵中的Vn蛋白酶酶切水解的1个信号。

在其他昆虫中，也有很多Vn降解时磷酸化或脱磷酸化调节的证据。在德国小蠊（*Blattela germanica*）卵中，Vn水解过程开始于排卵后第4d，在时间上与胚胎发育中蛋白质的利用是一致的。

卵黄磷酸化酶的表达也与上述进程相一致。产卵后第2d的卵黄中并没有酶的活性，到第3～4d却骤然增加20倍。此外，在Vn的早期降解中还可以看到磷酸酯酶的表达。用杂交获得的杂合子雄蜚蠊和野生雌虫交配后产下的卵中，卵黄磷酸化水平明显下降，使Vn不发生水解，导致胚胎不能发育，直至产卵第5d，仍保护着刚产下时Vn的亚单位组分，从中可看出磷酸化酶与Vn的关系，以及磷酸化酶在德国小蠊卵黄蛋白质水解过程中

的功能。Vn 的脱磷酸化作用也对蛋白质水解起调控作用，磷酸化与脱磷酸化也可能存在共轭效应。卵黄蛋白质中丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化或脱磷酸化导致蛋白质分子在一定区域发生构变，由此增加它们对蛋白质水解的敏感性。磷酸化酶的另一种功能是改变蛋白颗粒的膜，使膜上的磷脂受到破坏或修饰，从而改变膜的渗透性。

## 3.3 卵黄蛋白颗粒的酸化作用

卵黄颗粒中蛋白酶在活化前以潜在型进行贮存，家蚕中半胱氨酸蛋白酶以及蚊子的 VCP 是典型的例子。它们作为可活化的酶原存在于成熟的卵母细胞中，当胚胎开始发育时被活化。在离体条件下遇酸使卵黄颗粒酸化，导致家蚕半胱氨酸蛋白酶原由非活性型转化为活化型。Fagotto（1991）用吖啶黄（acridin orange）使卵黄蛋白颗粒酸化，从而引起蜱卵蛋白的酶原被激活，卵内蛋白的水解即呈平行发展趋势。在发育早期，所有卵黄蛋白颗粒是天然型的，随胚胎发育的逐步发育酸化程度也不断增加，这种变化一直到卵孵化为止。在大多数节肢动物的卵黄蛋白利用模式中，卵黄蛋白颗粒中只含组织蛋白酶 L 的前体，到后期卵黄颗粒变成为低密度片段时，组织蛋白酶 L 才被活化。这种通过卵黄颗粒酸化作用活化蛋白酶的方式与卵黄蛋白降解的方式不同。arteria 在卵黄颗粒中以原型的溶酶体方式启动卵黄球中蛋白质的水解，溶酶体以自体溶酶细胞器在酸化过程中使水解酶得到活化，其中包含蛋白质-ATP 酶的作用，这种现象在海胆卵中最为常见。当海胆胚胎发育早期卵黄糖脂蛋白进行有限的水解，其中可能受到半胱氨酸蛋白酶的催化。半胱氨酸蛋白酶在发育的卵黄颗粒中被活化。卵黄颗粒的酸化通过 cAMP 发生作用，它进入酸性细胞器中，可用电泳检测到，当 pH7.0 降到 6.2 时，即成为酶的最佳 pH 值，足以使酶原活化，启动以后蛋白的水解作用。

# 第十二章 昆虫雄性分泌物及其对雌性的作用

生殖是联系父代和子代的纽带。在昆虫的生命活动和种群变动过程中，没有比生殖更为重要的活动了。这是由于：①从进化的角度来看，一个不生殖的个体在进化上是没有意义的，它的基因在未来世代中消失。凡交配和生殖不强，产下的后代适应性差的个体，其基因库均具有类似的结果。因而不难想象，经过千百万年的自然选择而形成的多种多样的生殖行为和生理机制，均是对环境适应的结果。②昆虫生殖行为的高度适应性和惊人的繁殖能力，造成了暴发成灾的巨大潜能。如棉铃虫一生可产卵上千粒，对棉花生产构成极大的威胁。一旦气候适宜、食料丰富、天敌数量下降或抗药性上升，更可繁殖出巨大的数量，甚至连年猖獗，其防治的持续性与有效性一直困扰着农业生产。对昆虫生殖行为和生理机制的全面了解，在理论上可弄清很多进化难题，在实际中可更准确地掌握昆虫的种群动态，进行适时治理。

## 第一节 交配对生殖的影响

成功的交配是两性生殖的昆虫繁衍后代所必须的。研究表明，黄猩猩果蝇的交配仅持续 20min，但蛾类交配的持续时间则长得多，如三化螟和麦蛾交配时间均长达 2～3h。交配后，雌虫的行为和生理均发生了巨大的变化。这些变化包括以下几个方面。

### 1 降低对雄虫的吸引力

交配后的黄猩猩果蝇雌蝇较少被同种雄蝇追求。一方面是由于交配后雌蝇的引诱信息素的产生大幅下降，不具有吸引雄蝇的气味；另一方面，交配后的雌蝇的移动明显减少。由于视觉刺激

也是黄猩猩果蝇雌蝇吸引雄蝇的重要因素，明显减少的移动无疑降低了对雄蝇的吸引力。

与黄猩猩果蝇相似，很多鳞翅目雌蛾接受交配后，对雄蛾的吸引力也明显下降。Raina 等（1986）对交配引起美洲棉铃虫雌蛾性信息素变化的情况进行了研究。结果表明，交配抑制了雌蛾性信息素的产生。交配后不到 2h，腺体中性信息素 的含量与相同年龄未交配雌蛾相比降低了 93%。交配后 24h，性信息素含量虽然显著升高，达 37ng/腺，但仍显著低于未交配蛾（62ng/腺），直到交配后 72h，性信息素才恢复到未交配蛾水平。性信息素含量的降低，无疑使交配后雌蛾失去对雄蛾的引诱能力。随后对美洲棉铃虫的研究（Raina，1989）表明，交配一完成性信息素含量便降低，30 和 60min 后下降最显著，120min 后性信息素含量接近到检测下限。而不成功交配（保持交配状态 20min，且人工分开，未形成精包）者性信息素水平保持不变。Ramaswamy 等（1996）对由交配改变烟芽夜蛾的性信息素合成进行了研究。结果表明，交配立即降低了性信息素的产生，交配抑制因子来源于雄性生殖系统。Foster（1993）研究了交配对浅褐苹卷蛾（*Epiphyas postvittana*）的影响，结果表明，交配后 5～6h 性信息素含量便显著下降（7.7ng/腺，对照 33.8ng/腺），与去头的处女雌蛾相似（9.0ng/腺），交配后 24h 进一步下降至 1.5ng/腺，6d 后下降至 0.2ng/腺。可见交配能永久性的抑制性信息素的产生。在舞毒蛾中，Giebultowicz等（1990）的报道表明，2 日龄交配的舞毒蛾（*Lymantria dispar*）雌蛾的性信息素含量也立即下降，之后一直保持低水平。在粉螟 *Ephestia cautella* 中，Coffelt 等（1987）报道，交配使雌蛾的性信息素含量降低了 75%～99%。说明性信息素的含量的减少是交配后的雌蛾对雄蛾失去吸引力的重要原因之一。

交配后的雌蛾对雄蛾失去引诱能力的另一个原因是前者不再出现召唤行为。有召唤行为的雌蛾，在交配高峰期到来之前将性信息素释放出体外。不同雌蛾的召唤行为大致相同，如棉铃虫雌蛾在召唤时，两翅由静止时的屋脊状变为平伸，覆于腹上，腹部末端经几次伸缩，露出黄色产卵器及其前方呈白色环状性信息素分泌腺。如无干扰，可保持此状态数小时，直至破晓。三化螟雌蛾在召唤时，腹部向上弯曲，引起尾毛向上翘起，产卵器外伸，连续作微小的抖动或伸缩；曝露出第 8 和第 9 腹节，两翅略为平展，触角摆向前方或翅的两侧。小地老虎雌蛾在召唤时，先停息，伸出产卵器，扇动翅膀，有时则作短距离飞行。与其他蛾类不同的是，产卵器在伸出几秒或稍长时间后缩回，这种伸出或缩回的动作持续几分钟后，雌蛾转移至另一处再重复上述动作。偶而，雌蛾会将伸出的产卵器在接触物的表面拖动，分散香鳞。但在交配后，召唤行为不再展现。Raina 等（1989）对美洲棉铃虫交配后雌蛾行为进行了观察，发现交配过的雌蛾在当晚都不再展现召唤行为。在粉螟 *Ephestia cautella* 中，Coffelt 等（1987）报道，交配使雌蛾的召唤行为降低了 90%；Trumann 等（1971）证实成功的交配终止了惜古比天蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）的召唤行为。

## 2 降低对交配的接受能力

雌虫交配后在一定时间间隔期内，通常拒绝再次交配。这一现象在双翅目、鳞翅目和鞘翅目昆虫中均有报道。

在双翅目中，当黄猩猩果蝇的雄虫企图与已交配的雌蝇再次交配时，后者表现出强烈

的拒绝行为。当雄蝇接近时，雌蝇伸出产卵器，逃避迫近的雄蝇，有时还具有强烈的后踢动作。雌蝇的这种拒绝行为可持续 11d。只有在前次交配时贮存的精子消耗殆尽后，雌蝇才接受再次交配。在室内，相同数量的雄蝇与未交配雌蝇混合，1h 后 95%～100% 的雌蝇接受了交配，而相同数量的雄蝇与已交配雌蝇混合时，1h 后仅 5% 的雌蝇接受了再交配。交配后伊蚊 *A. taeniorhynchus* 的自源营养（autogenous）品系也明显具有拒绝再交配的行为。同样，交配后的采采蝇，也在一定时间间隔内拒绝再次交配。

鳞翅目昆虫的研究局限于有重要经济意义的蛾类。Raina 等（1986）观察，交配后美洲棉铃虫雌蛾很少活动，翅膀覆于背上，盖住腹部，展现出典型的拒绝交配行为。没有一个交配后的雌蛾在当晚对新放入的雄蛾产生反应并接受再次交配。当雄蛾靠近交配后雌蛾时，后者总是迅速移开，并有猛烈地蹬踢和扇翅动作。菜白蝶（*Pieris rapae*）经过正常交配之后，引发典型的拒绝再交配行为，将交配后菜白蝶的血淋巴注入处女蝶体内，也会使后者拒绝再交配（Sugawara，1979）。

鞘翅目昆虫中，一种药材甲 *Stegobium paniceum* 在雌虫交配后，也表现出明显的拒绝接受再次交配行为。

## 3 提高产卵量和加强产卵活动

成功的交配可极大地刺激产卵。在实验室条件下，未交配的黄猩猩果蝇雌蝇每天产卵 0～5 粒，而交配后产卵量陡升到每天 50～60 粒，显著高于未交配的雌蝇。这一差异可持续 9～11d，直到受精囊内精子耗尽后才消失。

棉铃虫在交配之后产卵量也会陡升，4 日龄时平均高达 210 粒/晚/雌，而同日龄处女雌蛾仅为 55 粒/晚/雌。

Albernathy 等（1994）对美洲棉铃虫雌蛾的研究表明，2 日龄雌蛾交配后几小时即开始产卵，24h 后（即 3 日龄）达到峰值，以后逐渐下降，至 10 日龄时降至与同龄处女蛾同样的水平。交配后 24h 产下的卵占总产卵量的 36% 以上，交配后 3d 后（2 日龄至 4 日龄）雌蛾产下了 56% 的卵，第一周产卵 78%；处女蛾在前 3d 和前 1 周只产下 10% 和 27%，而有 62% 的卵在存活的最后 6d 产下。此外，交配后雌蛾的总产卵量明显大于未交配个体。

Giebultowicz 等（1990）的报道，2 日龄交配后的舞毒蛾（*Lymantria dispar*）雌蛾 24h 内产卵量占总卵量的 60%～70%，之后逐渐下降，但仍然显著高于未交配对照。

交配后的吸血蝽 *Rhidnius prolixus* 的产卵量也显著提高。研究表明，交配雌虫的产卵量是处女雌虫产卵量的两倍。

在产卵量增加的同时，许多昆虫交配后产卵活动也明显增加。Pickford 等（1969）首先发现蝗虫 *Melanoplus sanguinipes* 的产卵活动可被交配所刺激。Ward（1988）也报道了药材甲 *Stegobium paniceum* 雌虫交配后增加飞行能力，积极寻找产卵场所产卵。

白菜根潜蝇 *Delia radicum* 的雌虫若怀有成熟卵，交配立即会引起寻找产卵寄主的行为（Notti ng ham，1988）。当交配时精子和精液充满受精囊，吸血蝽（*Rhodnius*）的产卵行为也会受到激发（Davey，1965）。O'Meara 等（1977）报道，交配刺激伊蚊 *A. taeniorhynchus* 的自发营养（autogenous）品系卵的发育。

### 4 贮存精子

黄猩猩果蝇每次交配后，雄蝇输入的精子达 4 000～6 000 条，其中 25%左右可被雌蝇贮存。贮存过程发生在交配后几小时之内。贮存的精子数足够产生 600～800 个后代，可被雌蝇利用达 14d 以上。

### 5 缩短寿命

处女雌成虫的寿命明显长于交配雌成虫。黄猩猩果蝇雌成虫交配后，在产卵量大幅上升的同时，寿命却显著下降。这由几个方面的原因引起，首先，产生后代耗去了大量的能量。不产卵的雌蝇寿命明显长于产卵个体。其次，雄蝇的存在（即使不交配）也可显著降低雌蝇的寿命，部分原因是由于雄蝇的不断追逐使雌蝇无足够的时间休息和取食。再次，来源于雄蝇的精液导致雌蝇缩短寿命。

交配也明显缩短了棉铃虫雌蛾的寿命。研究表明，在实验室条件下，未交配雌蛾的平均寿命达 17d，而接受交配的雌蛾只有 15.6d，明显短于前者。

## 第二节 引起雌虫交配后行为的刺激因子

正常的交配导致雌虫的生理和行为发生一系列变化。但引起这些变化的刺激因子是什么？是交配时的机械刺激还是交配过程中输入雌体内的物质？若是后者，这些物质是什么？它们是怎么样传导的？这些问题，引起了昆虫学家、生化学家和分子生物学家的极大兴趣，得到了广泛的研究。

### 1 刺激因子的来源

确实，在有些昆虫中，交配时的机械刺激可引起雌虫交配后的种种变化。例如菜白蝶（*Pieris rapae*）经过正常交配之后，精包充入交尾囊中的信号便足以引发雌蝶对再交配的拒绝行为（Sugawara，1979）。Sasaki 等（1984）证实，从移除睾丸的雄蛾处接受了空精包的烟草天蛾（*Manduca sexta*）短期内表现交配后行为。这种行为甚至可由交配囊的胀压引起。

也有的昆虫交配时的机械刺激可引发部分交配后行为。在美洲棉铃虫中，若将羽化初期移除了睾丸、贮精囊、复射精管和雄性附腺的雄蛾与处女雌蛾放在一起，它们能正常交配，并大部分（68%）能形成外形正常的空精包。这一过程虽不能使性信息素分泌腺中的性信息素含量显著下降，但可抑制雌蛾的召唤行为。

研究表明，育卵袋中卵鞘的存在使 *N. cinerea* 和其他蜚蠊拒绝接受再交配，若移除卵鞘则恢复接受雄性。

将玻璃珠置入采采蝇的子宫中，也可抑制雌蝇对求偶雄蝇的接受能力。长时间交配的物理刺激也是瓜蝇 *Bactrocera cucurbitae* 交配后雌蝇拒绝接受求偶雄蝇的主要刺激因子之一。在 *C. curtipennis* 中，移置玻璃卵到输卵管中，可抑制处理雌虫接受交配。

但在大多数昆虫中，交配时的机械刺激却不足以引起雌虫交配后的生理和行为改变。

如黄猩猩果蝇交配后雌蝇的行为和生理变化主要由输入雌蝇的精子和来源于雄性附腺的精液引起。早在20世纪60年代，Garcia-Bellido和Merle将成熟雄性附腺移入未交配同种雌蝇的腹内，引起后者产卵量的陡升和接受交配能力下降。进一步的研究表明，黄猩猩果蝇处女蝇若与缺少附腺分泌物和精子的雄蝇交配，交配1d后的雌蝇再交配率达86%，与对照处女蝇无显著差别（交配率95%）。而与缺少精子，但具有附腺分泌物的雄蝇交配，1d后再交配被部分抑制。这一结果表明，附腺分泌物和精子都是抑制雌蝇1d后再交配所必需的。对抑制交配后2d以上的雌蝇再交配，则附腺分泌物无任何作用，只有精子才能长时间地抑制再交配。对产卵刺激也有类似的情况。附腺分泌物和精子均可显著刺激交配后1d雌蝇的产卵量，但只有贮藏于受精囊内的精子才能长时间刺激产卵。

比较附腺移置和交配试验结果可知，前者仅附腺便导致了交配后雌蝇长期的行为改变，而后者附腺仅表现短期效应，必须有精子的存在才能长期维持这种改变。虽然这种差异可能是接受附腺分泌物的部位不同所致，即前者直接移置于血腔中，后者则在交配囊中。但正常交配时的这种两步控制法显然有利于雌、雄两性果蝇。对雌性果蝇而言，若与之交配的雄蝇无正常的精子，则在雄性附腺分泌物抑制作用消失后，雌蝇可立即接受再次交配，从而避免因产大量无效卵而浪费能量和时间。对雄性果蝇而言，附腺分泌物的短时间抑制交配，给了精子足够的转移时间。当精子到达受精囊后，则由精子行使抑制功能。精子从交配囊转移至受精囊需几个小时，在这段时间内，若无附腺分泌物的短时间抑制，则刚完成交配的雌虫由于受精囊内无精子而可能接受再次交配，将前一次交配的精子完全取代，从而不利于前次交配雄蝇基因在后代中的表达。

注射纯化的附腺分泌物PS-1到处女果蝇 *D. funebris* 体腔内，可降低处女蝇对雄蝇的接受性（Baumann，1974b）。

采采蝇的器官移植和注射实验，充分说明拒绝交配的原因是来自雄性附腺的分泌物（Manning，1962；Scott，1987）。对葱蝇 *Delia antiqua*、*G. morsitans* 和厩蝇 *Stoxys calcitrans* 进行的试验均表明，移置雄性附腺或注射雄性附腺抽提物，均可抑制处理雌蝇接受交配的行为。进一步研究表明，精液中的肽类和小分子蛋白在交配过程中或交配后，透过阴道壁进入血淋巴中，引起交配后雌虫的拒绝行为。

O' Meara等（1977）报道，伊蚊 *A. taeniorhynchus* 的自发营养（autogenous）品系卵的发育和交配后雄附腺给予的物质有关。这些由交配传送到雌体的附腺物质同时也刺激产卵和拒绝再交配。此外，还有多种雌蚊的交配后行为，可由雄性附腺的移植和注射萃取物诱发。当雌按蚊交配过程中接受精子时，同时也接受到胶质的交配阻碍物，阻挡了交配囊而使腹部膨胀。这个阻碍物使雌蚊无法再交配，直至交配后36小时，这个阻碍物溶解血淋巴中才恢复再交配能力。

在直翅目昆虫中，Pickford等（1969）的研究结果首先证实蝗虫 *Melanoplus sanguinipes* 的产卵刺激是由雄性附腺物质所引起的。

在半翅目昆虫中，吸血蝽在交配后，精子和精液充满受精囊，部分物质通过受精囊渗入到体腔中，控制产卵行为（Davey，1965）。同时，产卵量也由神经分泌细胞所分泌的亲肌素（myotropic factor）所刺激而增加（Davey 1967）。但雄性附腺物质和这种亲肌素是协同作用，还是由前者刺激后者释放而作用于生殖系统，至今仍无系统报道。

在鳞翅目昆虫中的研究更为广泛，Ramaswamy 等（1996）的研究表明，抑制再交配的因子来源于雄性生殖系统。在舞毒蛾中，Giebultowicz 等（1991）报道，交配时足够的精子或睾丸分泌物的转移是抑制雌蛾产生性信息素和终止召唤行为所必需的。虽然 Sasaki 等（1984）证实，空精包或交配囊的胀压可引起烟草天蛾（*Manduca sexta*）短期的交配后行为，但这种行为的保持却要依靠睾丸内物质。

在美洲棉铃虫中，交配时没有接受精包的雌蛾性信息素含量无变化，推测精包内物质抑制了性信息素的合成。用预蛹期移去睾丸的雄蛾与雌蛾交配，交配持续时间 90min，与未手术者无显著差异（102.6min），交配结束后，每雌交配囊内均具有 1 个无精子的精包，所有接受交配的雌蛾性信息素含量均显著下降（1.7ng/腺）。表明性信息素的降低由雄性附腺物质的输入引起。

可见，来源于雄性附腺的物质（有的种类还包括精子本身），是大多数昆虫引起交配后行为和生理改变的刺激因子。Young 和 Downe（1979）利用同位素示踪法发现，一次受精有 50%的物质直接来源于雄性附腺，其余 50%则由贮精囊射出，所以在刚交配完的雌虫体内不仅有大量精子，而且有大量的附腺物质，包括附腺细胞、细胞碎片和线粒体在内。

## 2　刺激因子的传导

若将成熟雄性黄猩猩果蝇的雄性附腺移入雌蝇的腹内，引发后者典型的交配后行为，这不仅说明了刺激因子的物质来源，而且通过采用组织移置的方法，证明了刺激因子可通过血淋巴传递。随后的试验结果表明，雌蝇交配后行为的表现也需要完整的神经组织如脑和胸部神经节的存在。精液中的刺激物质通过血淋巴传递到脑和胸部神经节作用位点，从而引起雌蝇交配后行为。此外，精子本身对雌蝇交配后行为的展现也具有一定的作用，精子在受精囊中存在的信息应该是通过神经信号传递至中枢的。

菜白蝶（*Pieris rapae*）经过正常交配之后，精包充入交配囊中，刺激传入神经将交配信息传至中枢神经系统进而引发交配后行为（Sugawara，1979）。Obata（1982）报道，交配后菜白蝶的血淋巴注入处女雌蝶体内后，引起了后者的拒绝接受交配的行为。可见，菜白蝶中，交配拒绝行为可由不同因子引起。其中交配后的机械刺激（精包信号）通过神经传入，而物质因子则可由血淋巴传递。

在舞毒蛾中，Giebultowicz 等（1991）报道，交配时足够的精子或睾丸分泌物到达受精囊后，通过刺激雌性生殖道内的感受器形成神经信号，传输至中枢而起作用。

Ando 等（1996）的研究表明，虽然 0.5 h 的交配在家蚕交配囊内能形成正常精包，并产受精卵。但正常的引起性信息素分泌腺永久性失活的交配必须持续 6h 以上，完成正常交配的雌蛾注入 PBAN 后又可导致性信息素的产生，交配后 6h 和 24h 雌蛾的 Br-SOG 提取液仍保持强烈地促性信息素活性。这表明交配后雌蛾的性信息素分泌腺仍有合成性信息素的能力，但交配抑制了 PBAN 的释放。进一步试验表明，切断腹神经索后，交配不抑制性信息素的产生。说明由交配引起的沿腹神经索上行的神经信号或物质抑制了 PBAN 的释放。

在美洲棉铃虫中，若将交配后 15min 的雌蛾血淋巴注入处女雌蛾中，引起后者性信息素含量的显著降低（从 114.6ng/腺降到 6.0ng/腺），而交配后 100 min 的雌蛾血淋巴对处女雌蛾的影响则小得多（76.4ng/腺）。同样，注入交配或未交配雄蛾的血淋巴也引起了处

女雌蛾性信息素含量的显著降低（6.3ng 和 6.1ng），接受了另一处女雌蛾血淋巴的处女雌蛾在注射后 30min 内，陆续与雄蛾交配，交配率达 80%，而接受了交配雌蛾血淋巴的处女雌蛾至少 90min 后才有少数个体（27%）交配（Raina，1989）。可见，存在于雄蛾和交配后雌蛾血淋巴中的某些物质激发处女雌蛾表现交配后行为。这些物质由交配引起，在血淋巴中存在一段时间后浓度逐渐降低。

## 3 雄性附腺分泌物的其他功能

雄性附腺分泌物除了改变交配后雌虫行为和生理外，还具有多种多样的功能。这些功能虽然在不同的昆虫中有所不同，也不是同一种昆虫的雄性附腺分泌物都具有这些功能，但其功能的复杂性可算动物之最了。

### 3.1 参与精子取代与竞争

雄性附腺分泌物参与了精子的取代和竞争。Harshman 和 Prout（1994）通过统计两次连续交配雌蝇的后代数目，发现第一次与正常雄蝇，第二次与无精但有附腺的雄蝇交配的雌蝇，其后代数明显少于与正常雄蝇交配一次的雌蝇。可见，第二次交配时附腺分泌物清除了第一次交配时存贮于受精囊中的精子。

### 3.2 启动精子在雌体内的转运与存贮

有些试验结果也表明，附腺分泌物可启动输入雌体的精子的转运和存贮。当雌性果蝇与缺少附腺分泌物但具有正常精子的雄蝇交配后，受精囊中的精子数显著少于与正常雄蝇交配的雌蝇，且有 17%的雌蝇受精囊中根本无精子（Kalb 等，1993）。

### 3.3 导致不同种或品系间的生殖隔离

雄性附腺分泌物也与生殖隔离有关。能相互交配的两种果蝇，杂交时后代明显少于种内交配。但杂交后雌蝇若再人工注射同种雄蝇的附腺分泌物，后代数量可大幅度提高，这是同种附腺分泌物可促进排卵的缘故。

### 3.4 营养功能

研究表明，在黄猩猩果蝇中，雄性附腺蛋白的营养功能很小。因为附腺中的蛋白量仅与 5 粒卵的蛋白量相当。

### 3.5 形成精包

交配开始后不久，雄性附腺分泌物开始外排。这些分泌物由多种蛋白质构成。它们依次排列而形成精包，其内充满精液和精子，形成的精包最终转运至雌体内。

## 4 雄性附腺分泌物的种类

对雄性附腺分泌物的研究表明，其主要成分是蛋白质类。分离和纯化产卵刺激蛋白或者性肽集中于直翅目和双翅目中。分离出的活性成分根据分子质量成为两组：一组为分子

质量（3～5）×$10^3$u 的肽类，它们溶于水和甲醇；另一组为分子质量为（13～100）×$10^3$u 的蛋白质，它们不能用甲醇抽提，不耐热，不能通过透析膜，可被硫酸铵沉淀。

此外，激素类、碳水化合物类、糖类等也均存在于雄性附腺中。至今为止，已分离和鉴定出不少雄性附腺分泌物。其结构、功能、分泌部位、作用方式等也进行了一些初步研究（表 11-1）。

**表 11-1　昆虫雄性附腺分泌物的化学成分**

| 昆虫种类 | 分泌物的化学成分 |
|---|---|
| 蜚蠊 *Periplaneta* sp. | 脂类、尿酸 |
| 蟋蟀 *Teleogryllus* sp. | 前列腺素合成酶 |
| 家蟋蟀 *Acheta domestica* | cGMP |
| 沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* | 黏多糖、脂蛋白 |
| 蚱蜢 *Melanoplus* | 蛋白质 |
| 吸血蝽 | 黏蛋白、糖蛋白、胺类 |
| 日本丽金龟 *Popillia japonica* | 黏多糖 |
| 鳃金龟 *Melolontha* | 糖原 |
| 大豆象 *Acanthoscelides obtectus* | 肽类 |
| 果蝇 *Drosphila* | 脂酶、蛋白质、肽类、脂类 |
| 伊蚊 *Aedes* | 蛋白质 |
| 家蝇 *Musca* | 蛋白质 |
| 葱谷蛾 *Acrolepia assectella* | 蛋白质、糖类 |
| 柞蚕 *Antheraea pernyi* | 肽类、葡萄糖、海藻糖、糖原、丙氨酸、丝氨酸、谷氨酸 |
| 家蚕 *Bombyx mori* | 前列腺素 |

# 第三节　性　　肽

成功的交配可极大地刺激产卵。在棉铃虫中，交配之后产卵量陡升，4 日龄时平均高达 210 粒/晚/雌，而同日龄处女蛾产卵量平均值仅为 55 粒/晚/雌。

在产卵量上升的同时，性接受能力却显著下降。一般认为，成功的交配由雌蛾的三个方面决定：①腺体内具有足够量的 SP 以吸引求偶雄蛾；②雌蛾能展现正常的召唤行为以释放 SP；③对求偶雄蛾的接受。而在很多研究过的鳞翅目昆虫中，这些方面常被交配改变，从而永久性或暂时性的使交配受到抑制。

影响交配后性行为改变的因子在多种昆虫中进行了研究，它们大都是来源于雄性附腺的肽类或蛋白类。

## 1　果蝇的性肽

### 1.1　果蝇性肽的化学结构

果蝇雄虫中特有肽的发现可归功于 Fox（1956）的研究。他在雄虫体液的色谱分析中观察到一个可水解的、茚三酮阳性斑点，但是在黄猩猩果蝇（*D. melanogaster*）雌虫中没有观察到，Fox 等（1959）将这种新的雄性特有物质称为“性肽”。Chen 和 Diem（1961）指出，雄性附腺体（paragonia）为性肽的产生部位。

随后，Chen 和 Buhler（1970）通过离子交换层析法，从大量的黄猩猩果蝇成虫中分离出性肽，分离和纯化的肽注入末交配的雌虫中时，处理雌虫的产卵量比未注射或仅注射了生理盐水的雌虫提高 2～3 倍。刺激活动似乎取决于所注入物质的量，而且在整个产卵期注射 1 次就足以维持高水平的产卵率。在交配的雌虫中可以检测出少量的性肽，而未交配雌虫却没有。说明性肽是由雄虫交配时引入雌体内的。

Chen 等（1988）测定了果蝇雄性附腺水和甲醇提取液的生物活性。其提取液可显著抑制处女果蝇的交配接受行为，刺激排卵和产卵等交配后行为。他们用反相高效液相色谱分离甲醇提取物，出现了 A、B、C 和 D 共 4 个峰值。生测结果表明，只有峰 C 表现出生物活性。采用反相高效液相色谱对峰 C 进行了两次再纯化，得到了具有生物活性的单峰物质。这一物质用胰凝乳蛋白酶水解后失活，表明分离成分为一多肽物质。对分离组分测序表明，黄猩猩果蝇的性肽由 36 个氨基酸组成，14 位在氨基酸分析未测出。根据 cDNA 编码推测为异亮氨酸，故此氨基酸可能是异亮氨酸的翻译后加工。由文献可知，在生物体内，异亮氨酸的翻译后加工为羟基化，如在具有 8 个氨基酸残基的 α-和 β-鹅膏蕈毒环肽中，含有 γ，δ-二羟异亮氨酸，γ- 鹅膏蕈毒环肽中，具有 γ-羟基异亮氨酸，故在黄猩猩果蝇性肽中，异亮氨酸的翻译后加工很可能是羟基化。

在黄猩猩果蝇的 7、8 位之间，存在着一个潜在的酶切位点，此位点可在翻译后加工中由内切蛋白酶剪切。

1989 年，Chen 和 Balmer 又分离鉴定了来自非洲塞舌尔群岛的果蝇（*D. sechellia*）雄性附腺中的性肽，该果蝇与黄猩猩果蝇亲缘关系很近，属于同一个族，肽链也由 36 个氨基酸组成。与黄猩猩果蝇的性肽同源率达 91%，仅 8 位上由谷氨酰胺取代赖氨酸，11、12 位上分别由精氨酸和酪氨酸取代赖氨酸和苯丙氨酸。

此后，又有 7 种与黄猩猩果蝇亲缘关系相近的性肽被分离。这些肽同源性很高，具有高度保守的富含色氨酸的 N-末端，高度特化的中段，含有几个羟化的脯氨酸和 1 个羟化的异亮氨酸和包含 2 个半胱氨酸的 C-末端。黄猩猩果蝇和 *D. sechelia* 的性肽结构特征非常明显，其他肽中不多见的羟脯氨酸在这两个肽中的含量很高，达 13.9%；色氨酸和精氨酸丰富，各达 5 个；其次为天冬氨酸和天冬酰胺，二者之和为 4 个，具有 2 个含硫氨基酸（半胱氨酸）（表 11-2）。

**表 11-2 已分离的果蝇性肽**

| 种 类 | 性肽氨基酸序列 |
| --- | --- |
| *D. melanogaster* | WEWPWNRKṖTKFṖİPSṖNṖRDKWCRLNLGPAWGGRC |
| *D. sechelia* | WEWPWNRQṖTRYṖİPSṖNṖRDKWCRLNLGPAWGGRC |
| *D. funebris* | AV（K）PSANANANNQRTAAAKPQANAEASS |

注：表中 Ṗ 表示羟脯氨酸，İ 根据 cDNA 序列推测应为异亮氨酸，但测序分析时未测出，推测为羟基异亮氨酸。

同样，Baumann 和 Chen（1973，1974）等在果蝇 *D. funebris* 附腺中分离到两种雄性特有的茚三酮阳性物质-PS-1 和 PS-2，其中 PS-1 是可以降低未交配雌虫对接近雄虫的感受性，而 PS-2 则刺激产卵。

Baumann（1975）等从 40g 雄性果蝇提取物中分离、纯化了 26.9mg 的肽，生物活性

总回收率为68.8%，通过自动的Edman降解和羧肽酶A消化，测定了PS-1的氨基酸序列。这是一个含有27个氨基酸的肽，其序列包含一些显著的特征，具有高的丙氨酸含量和丙氨酸-天冬氨酸的交替序列（出现4次）；结构中缺少芳族氨基酸和含硫氨基酸；第二位上可以是缬氨酸，也可以是赖氨酸。缬氨酸：赖氨酸的异质性比率为7:3。

### 1.2 果蝇性肽的功能

黄猩猩果蝇性肽的生理功能包括三个方面：Chen等（1988）测定了果蝇雄性附腺水和甲醇提取液的生物活性，表明它们均能刺激处女蝇表现出典型的拒绝交配的行为，即当雄蝇接近时，朝着雄虫伸出产卵器。当注射甲醇提取液之后，只有10%的处女果蝇接受交配，而只注射甲醇的90%个体进行了交配；处女雌蝇的排卵也被注射的甲醇提取液所刺激，刺激程度与交配刺激相当；同时，产卵量也被刺激，处理个体产卵平均43个，而同龄未处理个体仅为9个，交配后个体为48个。可见，甲醇提取液可显著抑制处女果蝇的交配接受行为，刺激排卵和产卵等交配后行为。

已分离的10个果蝇性肽可以明显分为两组：黄猩猩果蝇族的9个性肽同源性很高；而与果蝇 *D. funebris* 性肽PS-1的氨基酸序列几乎无任何同源性。这是由于性肽的多态性还是种的专一性，引起了 Chen 和 Balmer 的兴趣。他们饲养了黄猩猩果蝇族的 *D. melanogaster*、*D. mauritiana*、*D. simulans* 和 *D. sechellia* 分别用黄猩猩果蝇性肽、果蝇 *D. sechellia* 性肽和果蝇 *D. funebris* 性肽处理。结果表明，前两种性肽均可完全抑制4种测定果蝇的交配，而后一种性肽则不能。表明了果蝇性肽的种族间专一性。

### 1.3 黄猩猩果蝇性肽的分子生物学研究

为了鉴定出果蝇性肽的cDNA序列，Chen等（1988）对果蝇雄性附腺中的mRNA进行了克隆，并根据性肽氨基酸序列设计了两个寡核苷酸探针筛库，对阳性克隆筛选测序后得到了一个编码整个性肽氨基酸的cDNA片段，片段大小为255bp，可读框编码55个氨基酸（图11-1）。从这一结果可知，黄猩猩果蝇性肽大小确实包含36个氨基酸，与生化分析

```
NNNNAAAATG AAA ACT CTA GCC CTA TTC TTG GTT CTC GTT TGC GTA CTC GGC TTG 55
       Met Lys Thr Leu Ala Leu Phe Leu Val Leu Val Cys Val Leu Gly Leu 16

GTC CAG TCC TGG GAA TGG CCT TGG AAT AGG AAG CCT ACA AAG TTT CCA ATT CCG 109
Val Gln Ser Try Glu Try Pro Try Asn Arg Lys Pro Thr Lys Phe Pro Ile Pro 34

AGC CCC AAT CCT CGT GAT AAG TGG TGC CGT CTT AAT TTG GGG CCC GCC TGG GGT 163
Ser Pro Asn Pro Arg Asp Lys Try Cys Arg Leu Asn Leu Gly Pro Ala Try Gly 52

GGA AGA GTT TAAGATATGAATATTTGAGCTTAATATAAAATAAACCCACCCACCAAAATGTCTTAAAA 231
Gly Arg Cys ***                                                         55

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                                  255
```

图11-1 黄猩猩果蝇（*D. melanogaster*）雄性附腺中的性肽的cDNA及氨基酸序列

结果一致。表明果蝇将性肽排到附腺腔后，并未进行进一步加工；生化分析时也未破坏此肽结构。起始序列为WEWPWN，以半胱氨酸结尾，半胱氨酸之后紧跟结束信号TAA，这表明性肽的C-末端未酰胺化。此外，肽链中还具有另一个半胱氨酸。编码的55个氨基酸中，在黄猩猩果蝇性肽上游具有一长19个氨基酸的疏水性信号肽。这一疏水性信号肽

存在于许多肽类前体中，它可帮助目的肽透过细胞膜分泌。

采用原位杂交的方法，以黄猩猩果蝇多线染色体为材料，Chen 等（1988）进一步分析了性肽基因位置。研究结果表明，性肽基因位于常染色体 70A 位点处，基因单拷贝。Styger（1992）克隆出黄猩猩果蝇性肽染色体组基因后，比较性肽基因与 cDNA 的序列发现，性肽染色体组基因具有一个大小为 65pb 的内含子，将 cDNA 的可读框分为两个外显子，分别编码 39 个和 16 个氨基酸。

### 1.4 黄猩猩果蝇性肽的结构与活性关系

Schmidt 等（1993）比较了黄猩猩果蝇性肽的结构与活性的关系，结果如表 11-3。由表中可知，最短的 C-末端肽段 SP25～36 包含 C-末端的 12 个氨基酸残基。这一区域中有 5 个氨基酸残基与飞蝗亲肌肽同源，完全没有生物活性。C-末端肽段 SP21～36 包含性肽基因中第二个外显子的所有氨基酸残基，只表现出微弱的生物活性。这表明 C-末端区域不足以表达生物活性。

**表 11-3 黄猩猩果蝇性肽的结构与活性的关系**

| 性肽片段 | 氨基酸序列 | 生物活性 |
|---|---|---|
| SP | WEWPWNRK PT KF PIPS PN PRDKWCRLNLGPAWGGRC | + + + |
| | 8　　　　　　　　　　　　36 | |
| SP8～36 | K PTKF PIPSPN PRDKWCRLNLGPAWGGRC | + + + |
| | 21　　　　　36 | |
| SP21～36 | DKWCRLNLGPAWGGRC | (+) |
| | 25　　　　36 | |
| SP25～36 | RLNLGPAWGGRC | — |
| | 8　　　　　23 | |
| SP8～23 | K PTKF PI PSPNPRDKW | — |
| | 8　　　　20 | |
| SP8～20 | K PTKF PI PSPNPR | — |
| | 1 | |
| SPcm | WEWPWNRKP TKF PIPS PN PRDKW C(cm)RLNLGPAWGGR C(cm) | — |
| | 1　　　　　　　　　　　　34 | |
| SP1～34 | WEWPWNRK PTKF PIPS PN PRDKWCRLNLGPAWGG | — |

SP8～36 肽段具有与全肽相同的生物活性，表明处女果蝇的拒绝交配行为和排卵、产卵行为的诱导与性肽的 N-末端 7 个氨基酸残基无关。这表明若黄猩猩果蝇性肽若从第 7、8 位的潜在酶切位点剪切，并不影响其生物活性。

SP8～23 和 SP8～20 无任何生物活性，表明高度特化的中段并不足以单独表达黄猩猩果蝇性肽的生物活性。

SP1～34 失活表明最后 2 个氨基酸残基是性肽生物活性表达所必需的。若将性肽的半胱氨酸羟甲基化，所得产物失活，表明二硫键的存在的性肽活性表达不可缺少的。在已鉴定的 9 种黄猩猩果蝇近亲的性肽中，均在相同位置具有 2 个半胱氨酸分子。这表明了双硫

键的形成对性肽活性表达的重要性。从分子结构可知，黄猩猩果蝇性肽具有2分子半胱氨酸，它们可以形成分子内二硫键，也可以象飞蝗利尿激素那样通过分子间二硫键而形成同型二聚体。

若将未修饰的异亮氨酸替代羟化异亮氨酸，对性肽的生物活性并无影响。因此，至少用目前生测方法，异亮氨酸的羟化并不影响性肽的活性表达。同样，5个羟化的脯氨酸也不是活性表达所必须的。故这些翻译后加工的生物学意义，(如，它们是否在交配时转运过程中，进入雌体，然后穿过交配囊至血淋巴中或在雌体血淋巴中的抗酶解能力等)，仍需进一步研究。

N-末端1～7位上的氨基酸残基是活性表达所不需的。但它在已鉴定的与黄猩猩果蝇亲缘较近的种类中具有高度的保守性，而保守性一般是具有重要生理功能的指标。而且，在黄猩猩果蝇近缘种 *D. sechelia* 中，便不存在这一潜在酶切位点。因此，肽链被翻译出后，很可能仅切去19个氨基酸的信号肽即成为成熟的性肽分子，不需经过其他酶切加工。这种不需进一步的酶加工激活即具有活性的肽类分子在其他种类的肽中不多见。因为若无进一步的加工激活，肽类分子活性表达的时序和部位均无法准确控制。但性肽贮存于雄性附腺管腔内，交配输入雌体后，即表达活性，无需进一步加工来控制性肽的表达时间。因此不具有进一步的酶加工激活是可以理解的。N-末端的1～7位的氨基酸的重要性可能表现在其他方面，如性肽在雌虫体内的运输和稳定性。

### 1.5 黄猩猩果蝇性肽的合成和分泌部位

Chen 等（1988）采用 Northern 杂交的方法，分析了不同性别、不同部位 mRNA 的存在。结果表明，编码性肽的 mRNA 仅积累于雄性附腺细胞之中。显然，附腺是合成性肽的特化组织。研究表明，每次交配后，1/3～1/2 的雄性附腺分泌物被输送至雌体内，合成补充性肽以备再次交配是必然的。Chen 等的研究表明，雄果蝇交配后 30min 到 6h，大量核糖体在腺体细胞内出现，表明性肽合成的开始。

## 2 美洲棉铃虫的性肽

Albernathy 等（1994）对美洲棉铃虫雌蛾的研究表明，2日龄雌蛾交配后几小时即开始产卵，24h 后（即3日龄）达到峰值，以后逐渐下降，至10日龄时降至与同龄处女蛾同样的水平。24h 产下的卵占总产卵量的36%以上，3d 后（2日龄至4日龄）交配雌蛾产下了56%的卵，第一个星期产卵78%，而处女蛾在前3d 和前1星期只产下10%和27%的待产卵，而有62%的卵在存活的最后6d 产下。此外，交配后雌虫的总产卵量明显大于未交配雌蛾；交配雌蛾空交配囊移置至处女雌蛾后也可引起同样的反应。可见，刺激产卵的因子是来源于雄性的信息化合物而非交配的物理刺激。

Raina 等（1986）对交配引起美洲棉铃虫雌蛾 SP 变化的情况进行了研究。结果表明，交配抑制了雌蛾 SP 的产生。交配后不到2h，腺体中 SP 的含量与相同年龄未交配雌蛾相比降低了93%，交配后24h，SP 含量虽然显著升高，达37ng/腺，但仍显著低于未交配蛾（62ng/腺），直到交配后72h，SP 才恢复未交配蛾水平。SP 含量的降低，无疑使交配后雌蛾失去对雄蛾的引诱能力。随后的研究（Raina，1989）表明，交配一完成 SP 含量便降

低，30和60min后下降最显著，120min后SP含量接近检测下限。而不成功交配（保持交配状态20min且人工分开，未形成精包）者SP水平保持不变。无任何交配雌蛾在当晚再展现召唤行为，同时，交配后雌蛾很少活动，翅膀覆于背上，盖住了腹部，展现出典型的拒绝交配行为。无任何一个交配后的雌蛾在当晚对新放入雄蛾反应并接受再次交配。当雄蛾靠近雌蛾时，交配后雌蛾总是迅速移开，并结合猛烈地蹬踢和扇翅动作。由于交配后雌蛾的SP水平降至很低时需2h，故召唤行为的终止和拒绝交配行为的采取可使雌蛾在这段时间内不再引诱其他求偶雄蛾（Kingan et al，1993）。

不成功交配没有接受精包的雌蛾SP含量无变化，推测精包内物质抑制了SP的合成。用预蛹期移去睾丸的雄蛾与雌蛾交配，交配持续时间90min，与未手术者无显著差异（102.6min），交配结束后每雌交配囊内均具有一个无精子的精包，所有接受交配的雌蛾SP含量均显著下降（1.7ng/腺）。若在交配进行不到45min、45min和60min，人工将它们分开，测定雌蛾中SP的变化。结果表明，只有当精包转入雌蛾后，才引起SP的显著降低（Raina，1989）。若将羽化初期移除了睾丸、贮精囊、复射精管和雄性附腺的雄蛾（RG雄蛾）与处女雌蛾放在一起，它们能正常交配，并大部分（68%）能形成外形正常的空精包。但这一过程并不能使SPG中的SP含量显著下降。表明使交配雌蛾SPG中SP含量显著下降的因子来源于雄性附腺和复射精管中。与此不同的是，与RG雄蛾交配过的雌蛾的召唤行为却被抑制。表明交配过程或空精包足够抑制召唤行为（Kingan et al，1993）。

若将交配后15min的雌蛾血淋巴注入处女雌蛾中，引起后者SP含量的显著降低（从114.6ng/腺降到6.0ng/腺），而交配后100min的雌蛾血淋巴对处女雌蛾的影响则小得多（76.4ng/腺）。同样，注入交配或未交配雄蛾的血淋巴也引起了处女蛾SP含量的显著降低（6.3ng和6.1ng），接受了另一处女雌蛾血淋巴的处女雌蛾在注射后30min内，陆续与雄蛾交配，交配率达80%，而接受了交配雌蛾血淋巴的处女雌蛾至少90min后才有少数个体（27%）交配（Raina，1989）。对这一因子的部分分离与纯化表明这是一类在RP-HPLC上保留时间为35～38min的组分，具有一定的热稳定性，但其活性可被胰蛋白酶破坏（Kingan et al，1993），表明这是一种多肽（PSP）。

交配后雌蛾注射处女蛾的脑或Br-SOG匀浆液，结果表明，注射脑匀浆液的处理SP含量维持低水平（3.5ng/腺），而注射Br-SOG匀浆液的处理SP含量在短期内显著升高（99.4ng/腺），与同龄处女蛾无差别（Raina，1989）。

对PSP的进一步研究表明，极低浓度的PSP（0.05雄蛾当量）便可明显地延缓雌蛾召唤行为的展现。当浓度达0.5当量时，在注入后2h未观察到召唤行为（Kingan et al，1993）。PSP对召唤行为也有明显的抑制作用的事实，表明召唤行为的终止与SP含量的下降，不由相同的机制引起，前者既可由精包的存在又可由PSP的刺激所致，而后者则只由PSP的刺激引起。

Kingan等（1995）通过Edman降解自动测序、胰蛋白酶降解和CAD MS测定等方法分析了来源于美洲棉铃虫雄性附腺的活性肽PSP-1（图11-2），分析结果表明，这是一个碱性多肽，具有57个氨基酸，包含一个双硫键，肽的N-端由焦性谷氨酸封闭，C-端酰胺化。这种封闭是一种保护性结构，可以防止氨基和羧基肽酶的水解。在肽链的6位，可以

是天门冬酰胺或天门冬氨酸，由于 PSP-1 和 PSP-2 具有相似的分子量和相同的酶解已片段，故此 Kingan 等认为 PSP-1 是 6 位为天门冬酰胺和天门冬氨酸的肽组成的混合物，而 PSP-2 则为 6 位是天门冬氨酸的纯肽。

```
                        Tyr              10
poryGlu-Ile-Ile-Asn-Asn-Asn Asp-Tyr-His-Asp-Asp-His-His-Gly-Asp-Gln-Pro-Thr-
  20                                      30
Leu-Leu-Leu-Arg-Ser-Gln-Pro-Glu-Arg-Met-Arg-Pro-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-Asp-Ala-Phe
   40                                    50
-Gly-Gly-Pro-Cys-Pro-Pro-Ser-Ser-Phe-His-Lys-Leu-Lys-Asn-Tyr-Cys-His-Ile-Val-amide
            |                                             |
            S---------------------------------------------S
```

图 11-2 美洲棉铃虫性肽氨基酸序列

## 3 马铃薯甲虫的性肽

Smid 等（1997）用两次连续的 RP- HPLC 从 100 对马铃薯甲虫（*Leptinotarsa decemlineata*）的雄性附腺中分离到 1 种多肽（图 11-3）。此肽用 MAC-18 抗体通过 Western 杂交证实其分子量约为 8 000u，采用 Edman 降解测序仪分析了 N-端部分序列。此序列含有 40 个氨基酸残基。为了获取此肽的全部氨基酸序列，Smid 等用3'-RACE 和5'-RACE 扩

```
GTATATTTCAAGATG TTA AGA TTG GTG CTG CTC ATA TCT GTC ACA GTG ACA GCA ACA  57
                Met Leu Arg Leu Val Leu Leu Ile Ser Val Thr Ala Thr Ala Thr  15

TAC TCG TCG GAT CCT GAT CAA CAG ATG CAT CCT GGA TAC TCG GTG CAT CCT GGA 111
Tyr Ser Ser Asp Pro Asp Gln Gln Met His Pro Gly Tyr Ser Val His Pro Gly  33

TTT TCG GCG CAT CCT GGA TTT TCG ATT CAT CCT GGA TTC ATA ACA CAT CCT GGA 165
Phe Ser Ala His Pro Gly Phe Ser Ile His Pro Gly Phe Ile Thr His Pro Gly  51

TTT TCT GCA CAT CCA GGG TTC TCG TCG CAT CCT GGA TAC TCG GTT CAC TCT GGA 219
Phe Ser Ala His Pro Gly Phe Ser Ser His Pro Gly Tyr Ser Val His Ser Gly  69

AAC AGG GTT CAA TCT GGA GAC CAT GCT CAT CCT GAT TAC ACG AAT TAT CAT AGA 273
Asn Arg Val Gln Ser Gly Asp His Ala His Pro Asp Tyr Thr Asn Tyr His Arg  87

TCC TCC CTA AAA TGAAAGCATTATTGAATACTAGGTATATACTGTCAACGCCTGGTCCGTATGGAAA 340
Ser Ser Leu Lys ***                                                      91

ATTGTAAATTGAGAATAATATTTGGGTAACTAGTAATTATACATTCTCAGTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA 411
```

图 11-3 马铃薯甲虫性肽 cDNA 和氨基酸序列

增和建立 cDNA 文库的方法，克隆出了一含有 411 个碱基的 cDNA，可读框翻译 91 个氨基酸，N-端具有一含 17 个氨基酸的疏水性信号肽，故加工后的活性肽（Led-MAGP）含有 74 个氨基酸。Led-MAGP 是高度重复的，具有 7 个不完全重复，每个重复由 6 个氨基酸组成。第一个重复从 Pro-9 到 His-14，之后连着 6 个相似的重复，均具有 PGFSXH 结构（此处 X 可代表任意氨基酸），在第一个和最后一个重复，苯丙氨酸被另一芳香族氨基酸酪氨酸代替，在第四个重复，丝氨酸被疏水性异亮氨酸代替，每一重复的第 5 个氨基酸变化较大，若按此重复序列排列，7 个重复外的许多氨基酸均与重复内的对应位置上的氨基酸对应。由以上结构特点，根据 Chou 和 Fasman（1978）、Garnier 等（1978）的标准算法得出 Led-MAGP 的二级结构为 β-折叠。

查阅蛋白质数据库银行表明，N-端具有相似 6 个氨基酸重复的蛋白质仅有 1 种—ch-prp，这是 1 种存在于鸡脑和脊椎组织内诱导乙酰胆碱受体活性的蛋白质，分子量为 30 000u，具有 8 个 6 氨基酸的重复，这两种分子的同源率达 62.8%，二级结构均为 β-折叠，推测它们具有相似的活性。对于 ch-prp，它的作用是协助细胞内吞，而 Led-MAGP 由交配进入雌体后，立即穿过交配囊壁进入血液，与血液中的某类蛋白质（可能是卵黄蛋白）结合，因此 Smid 等认为 Led-MAGP 刺激卵细胞对卵黄蛋白的内吞作用，从而加快卵黄蛋白的沉积。

## 第四节 蛋白质

随精子一同输入雌体的雄性分泌物中，绝大部分为蛋白质。在很多昆虫中，一部分蛋白质形成精包，它们一般由射精管分泌；另一部分则成为精液，具有多种多样的生理功能，它们一般由雄性附腺和射精管共同分泌。

### 1 伊蚊雄性附腺蛋白

埃及伊蚊的雄性附腺物质有人称为“雄配偶素”（matrone）（Fuchs 等，1968）。因为它使雌蚊不再交配，这种活性物质含有至少 2 种不同的蛋白质分别称为 α 和 β（Fuchs 等，1969，1970；Hiss et al，1972），必须两种成分都同时存在才能抑制交配。只有 α 时并不能刺激雌蚊产卵，而 β 蛋白质单独存在也没有刺激功能。注射雄配偶素到伊蚊，不论以何次序注入，同时或不同时，必须两者都存在，才可测出雌体的生理反应。这显示在雌体内有两个接受部位。α 蛋白质也发现存在于果蝇中，当以此蛋白质配合 β 蛋白质注入伊蚊雌体时，亦会产生单配（monogamy）现象（Hiss 等，1972）。若将 β 雄配偶素与黄猩猩果蝇性肽一起注射，则可抑制处理雌蚊的交配行为，可见，性肽的生理作用与 α 雄配偶素相似。

埃及伊蚊的产卵行为也可由同时注射 α 和 β 雄配偶素或 β 配偶素和性肽引起。若单独注射，则 α 雄配偶素可刺激处理后雌蚊产卵，而 β 雄配偶素则无刺激作用。

### 2 黄猩猩果蝇的主要雄性附腺分泌蛋白

多种多样的果蝇雄性附腺的生理功能与附腺内多种多样的分泌物相一致。其中蛋白质

和肽类是附腺分泌物的主要部分。近年通过附腺提取物纯化、测序和附腺特异性 mRNA 的分离、克隆和序列分析，确定了部分附腺分泌蛋白质的序列，这些蛋白质均标记为 Acp##，其中##是在多线染色体上通过原位杂交测定的编码该蛋白的基因位置。正如 Von Heijne 指出的那样，这些分泌蛋白质在结构上均具有相似性，它们的 N-端均疏水，通常包含一个信号序列酶切位点。至今为止，具有这一特征的分泌蛋白已鉴定出多种，其中有 9 种已证实在交配过程中转运到雌蝇体内。这多种分泌蛋白可分为 3 组，除简单肽类在前一部分已介绍外，其它 2 组介绍如下。

## 2.1　激素原类似蛋白

已发现的几个附腺分泌蛋白 Acp26Aa、Acp29AB、Acp32CD 和 Acp76A 均属激素原类似蛋白，它们的分子量较大，剪去信号肽后仍具有 200～400 氨基酸，它们的转录产物均以信号肽序列开始，序列中含有大量碱性氨基酸，分布于酶切位点附近。

Acp26Aa 被送至雌体后剪切。剪切部位可能发生在 2 位、4 位、5 位和 7 位。Acp26Aa 为糖蛋白，它有一个 17 氨基酸的区域与软体动物的产卵激素（ELH）区域相似，有 11 个氨基酸相同，同源率达 65%。活性的 ELH 从腹神经节大细胞中的一个含 271 氨基酸的前体物剪切而来。ELH 可刺激软体动物的产卵相关肌肉的收缩，从而加快产卵。黄猩猩果蝇的另一种激素原类似蛋白 Acp76A 的 C 端的一段序列与丝氨酸蛋白酶抑制剂的共有序列高度同源，推测 Acp76A 为一种蛋白酶抑制剂。它在附腺分泌物中的存在，说明附腺分泌物中有些组分在适当时候的酶解对行使其功能十分重要。研究者在果蝇 *D. funlbris* 中也发现了一种可抑制蛋白酶活性的肽，这与黄猩猩果蝇的雄性附腺分泌蛋白 Acp76A 的功能相一致。而这些蛋白酶抑制剂的失活（很可能发生在交配后），使来源于附腺分泌物的蛋白酶剪切激素原蛋白，形成蛋白激素，行使多种功能。

## 2.2　大分子糖蛋白

Acp36DE 属于这一组。这一蛋白质具有 716 个氨基酸，是最大的激素原类似蛋白的 2 倍，它具有潜在的高度糖基化的区域（形成 O—或 N—键）和 10 个潜在的蛋白酶切位点。

## 2.3　黄猩猩果蝇分泌蛋白的功能

激素原类似蛋白 Acp26Aa 的结构特点暗示输入雌体后在生殖上的功能。这一蛋白前体具有与软体动物产卵激素（ELH）相似的区域。此外，Acp26Aa 在果蝇不同品系和种间高度多态。这种多态性在进化上具有重要意义，尤其与不同种或品系间的专化性密切相关。

尽管 Acp26Aa 的结构特点暗示了其功能，但人工合成的 Acp26Aa 若引入未交配的雌蝇中，由于不能像正常交配的雌蝇那样进行剪切和修饰，因而不能行使其生理功能。有鉴于此，Herndon 和 Wolfner（1995）首先筛选出了缺少 Acp26Aa 基因的突变品系，这一品系的雄蝇除不产生 Acp26Aa 外，在其他方面均正常，包括合成所有已知的附腺分泌蛋白、产生正常精子、合成酯酶 6（由雄蝇射精管合成的一种精液蛋白）及保护已输入受精囊内的精子，避免再次交配等。当缺少 Acp26Aa 的雄蝇与雌蝇交配后，后者表现出正常的拒

绝再次交配的反应，终生所产卵均可以正常受精，具有正常的生命周期，但交配后第1d，产卵量显著小于与正常雄蝇交配的雌蝇，而在以后各天中，产卵量无差别。这些结果表明，Acp26Aa的功能是刺激交配后雌蝇产卵量的立即上升。虽然与缺少Acp26Aa的雄蝇交配的雌蝇的产卵量仍显著高于未交配雌蝇，但这一结果并不奇怪，因为缺少Acp26Aa的雄蝇能产生正常的性肽，而性肽本身也刺激产卵。Acp26Aa与性肽的相互关系，只有等到筛选到缺少性肽的突变品系才能确定。这种相互关系不外乎2种：①Acp26Aa与性肽的作用位点相同，但只有两者都存在时才能最大限度地刺激交配后雌蝇产卵；②Acp26Aa和性肽均可刺激产卵，但刺激途径不同。第2种解释似乎更符合实验事实 Moshitzky等(1996)的研究表明，性肽可通过血液传递，到达内分泌系统而刺激卵巢中卵的发育。但若不加快成熟卵的产出速度，则由于负反馈作用，过多的成熟卵可抑制未成熟卵的发育。因此，只有同时刺激卵的发育和产出，才能极大地加快产卵。通过与ELH比较，Acp26Aa可能作为一种激素作用于循环系统或直接刺激生殖道上的肌肉系统而加快卵的产出。

交配后，Acp26Aa分布于交配雌蝇血液和生殖道中。Acp26Aa在交配过程中便可进入血液中，交配后数小时还能检测出血液中的Acp26Aa，但其靶标位点却未发现。Acp26Aa的另一部分则滞留于生殖道中，在此被剪切成较小的片段。这些片段在交配后数小时还能被检测到。随后的研究证实Acp26Aa酶切后，其主产物N端包含ELH相似位点。但至今为止，仍无直接证据证明是哪一段酶切产物刺激产卵。

如果Acp26Aa象ELH前体一样，酶切对于其行使功能是必需的，则知晓酶切的控制就显得尤为重要。由于没有一个研究者在附腺及其提取物中发现Acp26Aa的酶切片段，推测雌蝇提供了激发酶切活动的组分或场所。当合成的Acp26Aa注入未交配雌蛾生殖道时并不被酶切，表明参与Acp26Aa酶切的诸物质不能单独由雌蝇提供，其中有些活性成分肯定来源于雄蝇。不完全研究结果表明，也许在雄蝇附腺分泌物中具有蛋白酶抑制剂，如丝氨酸蛋白酶抑制剂类似物Acp76A或在果蝇 *D. funebris* 中发现的胰蛋白酶抑制剂。而当附腺分泌物在交配过程中进入雌体后，这些蛋白酶抑制剂失活，而使酶切发生。

黄猩猩果蝇的另一个分泌蛋白Acp36DE是一个大分子糖蛋白，分子质量达 $122u\times10^3$。这一蛋白质在雄性附腺分泌物中含量非常丰富，是考马斯亮蓝SDS凝胶电泳板上主要的蛋白带。编码Acp36DE的基因的多样性与后续交配的精子替换呈正相关。这表明Acp36DE在果蝇精子竞争中具有一定的作用。与这一推测功能相一致的是Acp36DE不像其他附腺分泌蛋白一样交配后转移至雌蝇血液中，而是滞留于雌蝇生殖道内，交配后几小时仍可在雌蝇生殖道中检测到，在交配后3～6h，Acp36DE随着第一批卵的产出而消失。若在不产卵的雌蝇中，Acp36DE可滞留在生殖道中至少达12h。

Acp36DE在交配过程中进入雌蝇生殖道，当大量精子进入受精囊后，Acp36DE便分布于精子贮存器官开口的输卵管壁上。这一蛋白质或由其参与组成的蛋白质复合体，可能结合于输卵管壁上，俘获随后进入的精子，构建Acp36DE复合体，形成保护受精囊的屏障，阻止后续交配（如果发生的话）精子替代受精囊中已有精子，从而参与精子的竞争。

## 3 迁徙蚱蜢雄性附腺蛋白

在迁徙蚱蜢 *Melanoplus sanguinipes* 中，通过附腺移置和附腺分泌物抽提液注射试验也证实，雄性附腺分泌物具有刺激产卵的功能。随后的研究进一步证实，刺激物质来源于迁徙蚱蜢的长透明管状腺中（迁徙蚱蜢附腺的一种）。Friedel 和 Gillott（1976）首先部分纯化了这种刺激蛋白，估计分子质量为 $30\times10^3$u。

Yi 和 Gillott（1999）对这种蛋白质的生物活性和分子特征进行了系统研究。注射 10μg从长透明管状腺中抽提出的蛋白，在 48h 内可激发 89%的 10 日龄成熟迁徙蚱蜢产卵。同样，若将抽提蛋白用硫酸铵沉淀再重新溶解，溶解产物可使 87%的处女雌虫产卵。这一溶解产物经两次 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱和一次 Sephadex G-100 柱纯化，得到了命名为 OSP 的活性成分。

OSP 分子质量为 $60\times10^3$u，SDS-PAGE 电泳结果表明，只有单一成分的分子质量为 $30\times10^3$u 的亚基，这一亚基对迁徙蚱蜢产卵无刺激作用。OSP 等电点为 5.5，氨基酸分析表明，这两个亚基的序列完全相同。OSP 共有大约 250 氨基酸，其中天门冬氨酸和天门冬酰胺含量最高，达 14.8%；接着为亮氨酸，占 12.2%；谷氨酸和谷氨酰胺占 12%。N 端的 21 个氨基酸序列也已确定，分别是：

Ala-Leu-Pro-Ser-Phe-Val-Pro-Ala-? -Lys-Lys-Asp-Asp-Pro-Lys-Leu-Asp-Glu-Glu-Phe-Phe

第 9 位的氨基酸未能测出，但可能是色氨酸。由于色氨酸在测序过程中被破坏，因此无信号。

OSP 的抗血清可显著降低纯化 OSP 和长透明管状腺抽提物的生物活性。当抗血清与蛋白质的比例为 1:0.25 时，使纯化 OSP 的促卵活性下降 75%，使长管的管状腺的促卵活性下降 72%。抗血清的交叉反应在交配雌虫的受精囊、黏性分泌物、卵荚均有发生，但处女雌虫却无交叉反应。

Cheeseman 和 Gillott（1988）从迁徙蚱蜢长透明管状腺中分离出的名为 LHPⅠ的蛋白，这是一个大分子糖蛋白，占长透明管状腺中蛋白质的 37%～51%，分子质量 $72\times10^3$u，由 2 个 $36\times10^3$u 的亚基组成。这一蛋白质的多克隆抗体可与交配后雌虫粘性分泌物和精包抽提物中相似分子质量的蛋白质发生交叉反应。进一步研究证明，LHPⅠ不参与精包的形成，而是精包结构展开所必须的，推测 LHPⅠ可能是润滑剂和增塑剂。

比较这两种蛋白质，发现 LHPⅠ与 OSP 不仅分子结构相似，分子质量差异不大，而且都具有相同的转移特性和场所。故推测这两种蛋白质可能为同一成分，而刺激产卵不过是这种蛋白质诸多功能之一。

虽然 OSP 对雌虫的作用方式仍不清楚，但免疫细胞化学和肌肉生理学的研究表明，OSP 本身便具有直接刺激输卵管肌肉的活性。

## 4 飞蝗的雄性附腺蛋白

Lange 和 Longhton（1985）在飞蝗 *Locusta migratoria* 半透明管状腺中部分纯化了的雄性附腺蛋白 OSP，这一蛋白质分子量约 $13\times10^3$u，可刺激飞蝗产卵。初步的氨基酸分析表明，这一蛋白质具有许多碱性氨基酸，其中赖氨酸含量最高。

### 5 酯酶6

Scott（1986）的试验结果表明，黄猩猩果蝇的一种雄性附腺蛋白酯酶6在交配过程中转移到雌蝇体内。这是一个羧酸酯酶，具有阻止再交配的作用，其活性可持续6～18h。在黄猩猩果蝇的多数自然种群中，酯酶6基因座具有2到多个等位基因，表明酯酶6本身的多样性。酯酶6集中分布于雄蝇射精管前端，交配开始2～3min转移到雌蝇体内。酯酶6在雄蝇射精管中的存在与精子的有效利用有关。当酯酶6输入雌体后，又与卵的受精和拒绝再交配密切相关。

在成熟雄蝇的射精管球中，具有一种乙酸酯，即顺-11-十八碳烯醇乙酸酯。这种乙酸酯在交配过程中也转移到雌蝇体内，它在雌蝇体内的存在可阻止再交配，因而是一种抗催欲信息素。酯酶6与顺-11-十八碳烯醇乙酸酯同时存在于果蝇射精管中，交配过程中，同时转移到雌蝇体内，且顺-11-十八碳烯醇乙酸酯为羧酸酯类。这些事实都表明顺-11-十八碳烯醇乙酸酯在雌蝇生殖道内可能是酯酶6的底物。

将电泳时快型和慢型的酯酶6同功酶混合，与顺-11-十八碳烯醇乙酸酯温育，这种乙酸酯的水解量与酶浓度和作用时间均成正比。单独使用快型同功酶或慢型同功酯，也得到了相似的结果。气—液色谱对水解产物分离证实顺-11-十八碳烯醇是其水解产物。

酯酶6活性在雄蝇羽化1～3d大幅上升，与此同时，雄性生殖道匀浆液对顺-11-十八碳烯醇乙酸酯的水解也随之增加。而无酯酶6基因品系的雄性生殖道匀浆液却对顺-11-十八碳烯醇乙酸酯无活性，也对其他合成酯类化合物无活性、这些离体结果表明酯酶6是雄性生殖道中的唯一的羧酸酯酶。

采用酯酶6活性不同的两个果蝇品系活体测定酯酶6的生物活性，当雌蝇与具有酯酶6基因或缺少酯酶6基因的雄蝇交配15～20min后，将雌蝇生殖道分别匀浆，匀浆液与顺-11-十八碳烯醇乙酸酯一起温育，与缺少酯酶6基因雄蝇交配的雌蝇匀浆液水解活性极低，而与具有酯酶6基因雄蝇交配的雌蝇，匀浆液水解活性是前者的4倍。这一结果说明，雌蝇生殖道中羧酸酯酶水解活性主要依赖于雄蝇生殖道中酯酶6的活性，这与离体测定结果一致。

雄蝇在交配过程中将大约200ng顺-11-十八碳烯醇乙酸酯转移到雌体中，这种乙酸酯在雌蝇生殖道中的消失速率很快，大约6h后70%乙酸酯消失，而每克纯化酯酶6每分钟能水解顺-11-十八碳烯醇乙酸酯55pmol。据此计算，每次交配时输入雌蝇生殖道中的酯酶6的质量约40ng。

酯酶6在果蝇雌性生殖道内，将顺-11-十八碳烯醇乙酸酯水解为相应的醇，对发挥这一乙酸酯的功能非常重要，这一点将在本章的其他部分介绍。

## 第五节 信息素

在昆虫的交配过程中，有些雄虫将某些信息素释放到雌虫体内，这些信息素具有驱避其他雄虫的作用。这种具有抗催欲活性的信息素可抑制其他雄虫对交配后雌虫的求偶行为，减少交配的可能性，从而保证了与之交配的雄虫精子的有效利用。如Happ（1969）

发现，黄粉虫（*Tenebrio molitor*）雄虫在交配过程中，将一种信息素转移至雌虫的体内，使交配后雌虫失去性引诱能力。Gilbert（1976）的研究表明，一种蝴蝶 *Heliconius erato* 的雄蝶也在交配时将一种信息素输入雌虫的体内，降低交配后雌蝶被其他雄蝶求偶的几率。黄猩猩果蝇雄蝇将一种乙酸酯输入雌体，阻止其他雄蝇接近已交配雌蝇。

## 1　顺-11-十八碳烯醇乙酸酯

交配后雌蝇挥发性抽提物对雄蝇求偶的刺激能力明显低于处女雌蝇的挥发性抽提物，表明交配后雌蝇失去性引诱能力。一方面是由于性信息素含量降低，另一方面则是存在抑制性的信息素。Butterworth（1969）发现，黄猩猩果蝇雄虫在交配时，将一种酯类化合物转运雌蝇体内。随后鉴定出这种酯类化合物为顺-11-十八碳烯醇乙酸酯。据此研究者认为，可能是顺-11-十八碳烯醇乙酸酯使交配后雌蝇失去了性引诱能力。Jallon 等（1981）通过行为观察，发现顺-11-十八碳烯醇乙酸酯可降低求偶雄蝇扇翅频率，而这一行为是求偶雄蝇所必需的。可见，顺-11-十八碳烯醇乙酸酯至少部分影响了雄蝇的求偶。

Mane 等（1983）研究表明，与顺-11-十八碳烯醇乙酸酯一同由雄蝇转移到雌蝇体内的酯酶 6，可在雌蝇体内将顺-11-十八碳烯醇乙酸酯水解为乙酸和顺-11-十八碳烯醇，而在体外，无论顺-11-十八碳烯醇乙酸酯还是顺-11-十八碳烯醇均可抑制果蝇的交配。

Stephen 等（1986）的进一步试验表明，将顺-11-十八碳烯醇乙酸酯、顺-11-十八碳烯醇涂沫于去头的雌蝇体上，与对照相比，顺-11-十八碳烯醇乙酸酯在 200～500ng 使用剂量内，对雄蝇求偶行为表现出最大的抑制作用；顺-11-十八碳烯醇则在 25～50ng 抑制作用最大；若将不引起行为反应的低剂量的顺-11-十八碳烯醇加入顺-11-十八碳烯醇乙酸酯中，可明显提高后者的生物活性。可见，两者相混具有显著的增效作用。同样，若将顺-11-十八碳烯醇乙酸酯和顺-11-十八碳烯醇涂沫至活体处女雌蝇上，接入成熟雄蝇与之交配，与对照相比，这两种物质对交配也具有明显的抑制作用。其中顺-11-十八碳烯醇乙酸酯在剂量达 100ng 以上时抑制交配作用显著大于对照，而顺-11-十八碳烯醇则在 25ng 以上时显著抑制交配。

交配时，雄蝇转移到雌蝇的顺-11-十八碳烯醇乙酸酯为 200～300ng，这一剂量正好与生测时的有效剂量相当，故能立刻降低雄蝇的求偶次数。在交配过程中或交配之后，一同进入雌体的酯酶 6 将部分顺-11-十八碳烯醇乙酸酯水解，形成顺-11-十八碳烯醇，两者相混后产生明显的增效作用，使抑制求偶的有效剂量大为降低。这不仅增强了顺-11-十八碳烯醇乙酸酯的活性，而且由于有效剂量的降低，也增加了抑制能力的持久性。

进一步的研究结果表明，酯酶 6 在进入雌蝇体内后，很快转移到血淋巴中，顺-11-十八碳烯醇乙酸酯的转移场所虽尚未研究，但这个化合物在生殖道中也下降很快，交配后 4h 剩余 63ng。也许，大量的顺-11-十八碳烯醇乙酸酯也很快转移至血淋巴中，若果真如此，则血淋巴中是酯酶 6 水解顺-11-十八碳烯醇乙酸酯的场所。水解产物顺-11-十八碳烯醇及未水解产物顺-11-十八碳烯醇乙酸酯很快可通过血液到达全身，渗透表皮后散发至空气中，使交配后雌虫表现出特有的气味。

剩余的顺-11-十八碳烯醇乙酸酯则滞留于生殖道内，可能在雄蝇接近时，由雌蝇选择性的释放，从而起到驱避作用。

除了以上作用外，顺-11-十八碳烯醇乙酸酯还是雄蝇气味的主要组分，雄蝇凭此气味相互识别。刚羽化不久的雄蝇，由于不具有顺-11-十八碳烯醇乙酸酯，经常被其他雄蝇当作求偶对象。而当其逐渐长大后，则不会被其他雄蝇当作求偶对象。可见，交配时雄蝇将顺-11-十八碳烯醇乙酸酯输入雌蝇体内，也许是将雌蝇伪装成雄蝇，以躲避其他雄蝇求偶的一种策略。这种策略由于极大地减少了其他雄蝇的求偶，可使输入的精子能有效利用，使与之交配的雄蝇具有大量后代，因而有利于雄蝇。同样，交配后的雌蝇可免受打扰，从而具有更多时间觅食和产卵，因而也有利于雌蝇。

若将顺-9-十八碳烯醇乙酸酯涂沫于去头的雌蝇体上，则不表现明显的生物活性。可见，分子中双键的位置对活性表现十分重要。

## 2 雄性袖蝶输入的信息素

交配后的 *H.erato* 雌蝶被打扰时，释放出一种类似苯基碳酰胺或榛味的气味，而处女雌蝶不具有这种气味。这种气味在雄蝶身上也难闻到。气味由一对称之为“臭味棒”的外伸的腹腺散发。这种气味具有防御功能，求偶时也发挥着作用。

在 Gilbert 的养虫室内，养有 *H.erato* 的 4 个品系，其中来自哥伦比亚的地理宗 *H.chestertonii*，交配后雌蝶具有一种极易区分的、很芳香的气味。将 *H.chestertonii* 与 *H.adanus* 杂交，所有与 *adanus* 雄蝶交配的 *chestertonii* 雌蝶，均具有 *adanus* 的气味，所有与 *chestertonii* 雄蝶交配的 *adanus* 雌蝶，则均具有 *chestertonii* 雄蝶的特有气味。杂交 1 代的蝴蝶具有中间型体色。当 *adanus* 和 $F_1$ 代雌蝶与 $F_1$ 代雄蝶杂交时，具有中间型气味，$F_1$ 代雌蝶与 *adanus* 雄蝶回交，交配后雌蝶具有 *adanus* 气味。可见，无论何种交配，交配后雌蝶的气味总是和与之交配的雄蝶相同，表明了这种气味的雄蝶来源。

将交配后的雌蝶腹部移近雄蝶群时，当距离几厘米时，雄蝶立即激动起来，移动触角和下唇须，并在数秒内分散。可见，交配后雌蝶腹部具有明显的驱避雄蝶的作用。

对 *H. charitonia* 的观察结果也表明，交配后雌蝶腹部具有相似的驱避活性。

由以上结果可知，“臭味棒”上的臭味物质由雄蝶转移到雌蝶。这种气味具有抗催欲活性，阻止雄蝶的求偶，避免再交配。交配后雌蝶对雄蝶的驱避活性可达几个星期甚至几个月。这表明交配时转移的臭味物质或其前体物数量巨大，因而应有与这种物质的产生、转移和贮存相关的结构。

雌蝶腹部伸出的腹腺“臭味棒”应该是臭味物质或其前体物接受和存贮结构。交配之后，“臭味棒”膨大，颜色加深，表明其在交配过程中被充满。Eltringham 等在雄蝶抱握器上发现了一对腺体，估计是臭味物质或其前体物的产生场所。当雌、雄交配时，雌蝶腹部的“臭味棒”刚好嵌入抱握器腺形成的小袋中。此时，臭味物质或其前体物便由雄虫抱握器腺体细胞分泌出，由“臭味棒”上腺体细胞吸收。

显然，如此完善的结构只有对雌雄虫均有利的情况下才能在进化过程中形成。在 *H. erato* 中，最先交配的雄蝶的精子具有优先受精权，不会被随后的交配输入的精子所取代。故不必进化出驱避机制，以保证本身输入雌蝶体内的精子的有效利用。当然，依靠交配时雄蝶所给的臭味物质，雌蝶可避免被其他雄蝶求偶、交配所造成的伤害，也可避免其他雄蝶的打扰，以保证足够的时间寻找产卵场所，并产卵。雄蝶则可从这种气味中鉴别出那些

已被交配的雌蝶，从而更易寻找到合适的配偶，避免了时间和能量的浪费。如此完善的进化结构也许具有更为深层的进化动力。

## 第六节 激 素

雄虫为了控制交配后雌虫的行为和生理改变，甚至直接输入激素。已有研究报道的激素包括前列腺素、亲肌肽类和保幼激素.

### 1 前列腺素

前列腺素（prostaglandins，PG）是一种五碳环的不饱和脂肪酸，在脊椎动物中具有多种功能，包括一系列控制生殖的功能。

#### 1.1 前列腺素或其合成酶的产生部位和传输

Destephano 等（1974）首先证明昆虫也具有前列腺素。他用雄性家蟋蟀作为试验材料的结果表明，在雄的生殖组织中具有前列腺素合成酶 PG E2，这种前列腺素合成酶只在雄虫精包和其他生殖道发现。随后的研究表明，家蟋蟀前列腺素合成酶 PG E2 前体位于附腺贮精囊和精巢中（Destephano 等，1977），昆虫交配时把精子和其他内含物包括前列腺素合成酶前体传送至雌体。而蟋蟀 *Telleogryllus commodus* 的前列腺素合成酶位于精巢内，交配过程中与精子和其他精液一起传输到雌蟋蟀的体内，进而随精子一起进入雌体受精囊中。Ai 等（1986）指出，受精囊是前列腺素生物合成场所。研究表明，蟋蟀中前列腺素合成酶前体进入受精囊转化成含 20 个碳的 PG E2，后者显示出酶活性，合成前列腺素而行使生理功能，引发雌虫交配后行为和生理变化。

飞蝗的雄性生殖系统中也具有前列腺素合成酶复合体。但这些化合物在雄性体内便具有活性，可促使前体物合成前列腺素。合成产物贮存于贮精囊和附腺的乳白管状物中，而附腺其他部分或其分泌物中以及精巢中均不存在。此外，Setty 等（1979，1980）研究，发现家蚕交配过程中物质输送时，前列腺素也由雄蛾直接传至雌蛾体内。

#### 1.2 前列腺素的生理功能

##### 1.2.1 刺激产卵

关于前列腺素及其对雌体受精囊的影响报道只有几例。把交配后的蟋蟀切除受精囊或切断导精管，其产卵量降低到和处女雌体一样少，移植已交配雌体的受精囊（让其破裂）到未交配雌体内其产卵量增加 3 倍。因为 PG E2 存在于交配后的雌虫体腔中，研究者据此认为，受精囊的前列腺素是由生殖腔进入体腔再输送到中枢神经系统的未知接受器，引起产卵量大幅增加。这种功能可由两种不同效应引起，一种是刺激卵的发育，另一种则是刺激输卵管的肌肉收缩，促进排卵和产卵。

Destephano 等（1977）和 Lober（1983）的研究结果表明，前列腺素可促使蟋蟀卵成熟。Oliver 等（1984）注射雄蜱 *Ornithodoros parkeri* 生殖组织匀浆物对雌性产卵行为和

产卵量并没有显著影响，有趣的是当注射唾液腺匀浆物时则刺激卵成熟，进一步研究表明，前列腺素存在于此种蜱的唾液腺中。

Desphamo 等（1977）在家蟋蟀中发现有促使处女雌虫产卵的 PG E2 类似物。注射 PGE2到怀成熟卵 *Telleogryllus commodus* 处女雌虫的体腔或输卵管内，会引发其产卵活动（Loher，1979；Loher 等，1981）。PGE2 对雌蟋蟀的各种影响表现出数量关系。注入量少时，只会促进产卵；当注射量增加到一定值时，可进一步引起其他交配后行为。进一步研究发现，PG E2 可促使 *Telleogryllus commodus* 输卵管肌肉收缩（Loher，1984），导致排卵量增加。这一结果与产卵行为中神经系统的复合活动（Stanley-Samuelson 等，1983，Loher，1984）和前列腺素作用于中枢神经系统的假说相符。

PG E2 对未交配雌蝇的各种影响也表现出数量关系。注入量少时，这种前列腺素合成酶可明显促进家蝇产卵（Riemann et al 1969）。Oliver 等（1984）对雄蜱 *Ornithodoros parkeri* 的研究结果也表明，当注射含有前列腺素的唾液腺匀浆物时可明显引发产卵。

### 1.2.2 拒绝再次交配

一般而言，PG E2 对雌蟋蟀的各种影响表现出数量关系。注入量少时，只会促进产卵；当注射量增加到一定值时，可进一步刺激未交配雌虫拒绝交配。同样的结果也在雌性家蝇中得到了证实（Riemann et al，1969）。

## 2 亲肌肽

在飞蝗 *Locusta migratoria* 中，Large 和 Loughton（1987）发现，雄性附腺分泌物具有刺激离体输卵管运动，激活腺嘌呤环化酶的作用。随后 Paemen 等（1990）进一步研究了雄蝗附腺分泌物，发现刺激因子为一肽类，经 Sep-Park 柱后，洗提于 30%乙腈中，当相当于 0.00625～0.025 雄蝗分泌量的活性肽刺激离体输卵管后，输卵管节律收缩明显扩大；当浓度增加到 0.5～3 个雄蝗分泌量时，输卵管收缩的幅度增加，附着其上的肌肉紧张度加强；当浓度增加到大于 75 个雄蝗分泌量时，输卵管上肌肉紧张度急剧增大，只能进行小幅收缩；当洗去活性肽后，输卵管才又恢复到大幅收缩。无论活性肽使用浓度多高，彻底洗去后，输卵管总能恢复到正常收缩状态。

采用高压液相色谱进一步分离 30%乙腈洗提物，发现了 15 个有刺激活性的组分。这些组分分布于两个区域，即 4%～12%乙腈洗提液和 21%～34%乙腈洗提液中。用乙腈洗提雄蝗透明管状腺、白色半透明管状腺和贮精囊匀浆液，发现每一部分均有刺激输卵管的洗提组分。且这些活性组分均位于以上两个洗提区域。根据以前的研究结果，直肠素应在 4%～12%乙腈洗提液中。这些活性组分对输卵管的收缩刺激可持续 5～10min，这与经典神经递质仅刺激突触后瞬时反应不同。此外，Peamen 等试验结果也表明，活性组分煮沸 30min，冷却后仍具活性，但与链霉蛋白酶在 37℃下温育 2h，便失去了刺激活性。这些结果均说明活性组分为亲肌肽类。

Peamen 等用相同的洗提方法得到了处女雌蝗和交配后雌蝗的受精囊洗提物，并测定了高压液相色谱的分离组分对输卵管的活性。处女雌蝗的活性组分在 4%～12%乙腈洗提区，而交配后雌蝗分离组分则在 4%～12%和 21%～34%乙腈洗提区均存在。此外，精包

中的分离组分也在两个洗提区具有活性，表明交配后雌蝗受精囊中21%～34%乙腈洗提区的活性组分来源于雄蝗，注入雌蝗输卵管后，刺激输卵管蠕动，有利于精子运输、排卵和产卵。

### 3 保幼激素

在雄性昆虫中，咽侧体对精子发生没有积极作用。减数分裂和精子成熟通常是在JH缺少的变态期对蜕皮素发生的反应。某些昆虫的减数分裂甚至是在JH滴度下降的最末龄虫期开始的。尽管如此，许多雄虫常将JH富集于生殖系统内，在交配过程中释放到雌虫体内，引起雌虫生理和行为的改变。如雄性惜古比天蚕蛾的附腺吸收JHI酸，在附腺里将其转化为JHI并贮存起来。

在粉螟 *Ephestia cautella* 中，Shirk（1980）研究表明富集于雄蛾的内源JH，在交配过程中释放到雌蛾的交配囊中。

## 第七节 生殖的激素调控及交配的影响

保幼激素和蜕皮激素是调节和控制昆虫生殖的主要激素。而交配后雌虫和雄虫的行为和生理变化，总是直接或间接地由保幼激素和蜕皮激素所导致。

### 1 生殖的激素调控

#### 1.1 激素对卵黄发生与附腺的作用

不同的昆虫中，激素调节卵黄发生的模式也不完全相同。对于成虫期不取食、羽化后立即交配产卵的昆虫，此时处于保幼激素缺乏而蜕皮激素作用之下，属于脑—前胸腺系统的调节。但是对于成虫期仍取食的昆虫，则其性成熟一般都需要保幼激素，属于脑—咽侧体系统调节。但对于成虫期咽侧体活性已损失的种类，也有可能由蜕皮激素调节。

对于成虫期仍取食的昆虫，一般在蛹期产生卵母细胞，直至成虫羽化后，脑神经分泌细胞分泌神经肽再次激活咽侧体，分泌保幼激素，使卵母细胞继续发育。吸血蝽末龄若虫在1次吸血之后的临界前切除咽侧体，卵母细胞就不能沉积卵黄蛋白，只有再移植一个具活性的咽侧体，或与别的正常雌成虫联体，卵母细胞才能获得沉积卵黄蛋白的活性。

保幼激素能够激活卵胎生蜚蠊育囊的附腺，使它分泌出液状蛋白质，作为幼虫发育的养料。附腺的发育程度与激素滴度呈明显的正相关。因此，可以用离体培养附腺的方法，来测定保幼激素的滴度。反之，如果摘除咽侧体，就能阻止育囊附腺的发育。

保幼激素对卵黄发生的作用时间不是恒定的，即使在同一个分类群体内也是这样，更随着种类不同而异。例如，在保幼激素刺激下开始卵黄发生的时间，烟草天蛾是在成虫羽化之后，但家蚕在蛹期就已经开始了。

不论作用时间的早晚，保幼激素对卵合成的影响总是发生在以下阶段。在卵黄发生前期，保幼激素促使脂肪体由蛹型转变为成虫型，并使其具有卵黄原蛋白合成能力，同时保幼激素又作用于卵母细胞，使其具有摄取卵黄原蛋白的能力；在卵黄发生期，以蝗虫为代

表的半变态昆虫中，保幼激素首先启动脂肪体内卵黄原蛋白合成系统，促进并维持脂肪体对卵黄原蛋白的合成。

对于成虫期不取食、羽化后立即交配产卵的大蚕蛾、家蚕蛾等昆虫，蛹期时卵几乎都已成熟，此时处于保幼激素缺乏而蜕皮激素作用之下，完全由蜕皮激素调控卵的产生与成熟。

一部分昆虫的卵巢发育和沉积卵黄蛋白依靠蜕皮激素的调控，如伊蚊、丽蝇、蟋蟀等。

由于大多数昆虫的前胸腺在卵黄发生之前已经萎缩，因此一度被人认为蜕皮激素与卵母细胞发育无关。但是，近年来发现有些卵巢自身能合成蜕皮激素。蝗虫和蜚蠊的卵巢也有合成蜕皮激素的能力，合成的激素一部分渗漏到血淋巴中去，其滴度与卵巢中的滴度呈平行关系。在埃及伊蚊中，羽化后卵母细胞发育到休止期，吸血刺激脑神经分泌细胞分泌卵发育神经激素，后者顺次刺激卵巢分泌蜕皮激素。蜕皮激素“打开”脂肪体内卵黄原蛋白合成系统的开关，促进和维持卵黄原蛋白的合成。

对家蝇卵黄发生与激素调节的研究证明，保幼激素可以促进卵黄发生前期和后期脂肪体的卵黄原蛋白的合成；β-蜕皮素可以大幅度促进卵黄发生期家蝇脂肪体的卵黄原蛋白合成。两种激素共同处理对卵黄发生前期和卵发生期的家蝇脂肪体有协同作用，而对卵黄发生后期脂肪体没有这种作用。

### 1.2 激素与精子发生和形成的关系

激素与精子发生和形成的关系，迄今为止知道得较少。在吸血蝽和蜱虫体内，蜕皮激素能刺激精原细胞的分裂，加速细胞分裂的周期。在惜古比天蚕蛾体中，蜕皮激素可能作为载体来加速一种血液因子，它能穿透围膜，对精子产生刺激作用。具有蛹滞育习性的夜蛾，精巢发育在滞育期处于停滞状态，这也与蜕皮激素有关。

保幼激素具有颉颃蜕皮激素的作用。切除惜古比天蚕蛾体内的咽侧体，就能除去颉颃作用，保持蜕皮激素对精原细胞分裂的影响。相反，注射保幼激素会使精子发生受到抑制。

虽然精子的成熟不需要保幼激素，但很多雄性昆虫副性腺的正常发育需要保幼激素。这些腺体的分泌物组成精包，并在生殖中有不同的作用。有的作为精子活性的激活剂，有的引起雌性行为的改变。例如，切除了咽侧体的雄性迁徙蚱蜢（*Melanoplus sanguinpes*）仅能产生它们正常蛋白全量的25%。而且，腺体的分泌物中缺少两种不同的、在正常昆虫体内已发现的抗原蛋白，这两种蛋白的一种能使雌虫发生产卵行为。当把保幼激素供给切除咽侧体的昆虫后，这些蛋白又出现了。人们推测JH对促进特殊蛋白的合成有直接的作用。

## 2 交配影响雌虫的神经激素途径

### 2.1 交配刺激因子传递的神经激素途径

在 *B. craniifer* 中，试验证明截断腹神经索可部分恢复卵鞘对接受再交配的抑制作

用。这一行为改变是感觉刺激的结果，还是具有神经内分泌的参与，至今仍无系统的研究结果。在 *C. curtipennis* 中，雄虫若与去除咽侧体的雌虫进行交配，并不抑制交配后雌虫接受再交配。移置玻璃卵到输卵管中，可抑制处理雌虫接受交配，但若置入精包则无明显的结果。这一试验结果表明，输卵管中卵的机械刺激是这种昆虫拒绝接受交配的直接原因，而这一刺激因素可能通过保幼激素的释放起作用。

摘除家蝇咽侧体或卵巢，均可部分去除先前的交配对后续交配的抑制作用。但初次交配率却因咽侧体或卵巢的摘除而降低。去除交配后家蝇的头，可恢复交配后雌蝇对求偶雄蝇的接受性。研究表明，去头雌蝇 72% 的个体接受了 3 次交配，而不去头的对照接受 3 次交配的百分率为零。

在埃及伊蚊中，本身交配状态的感觉信息传到腹末神经节而非脑或咽下神经节，神经中枢处理这些信息后，决定是否拒绝交配。移除交配后雌蚊的腹末神经节，可部分恢复雌蚊对求偶雄蚊的接受能力。

增高的保幼激素滴度，可刺激雌虫产卵却在很多昆虫中得到证明。Shaaya 等（1991）证明 JH 类似物蒙 515 可刺激处女 *Ephestia Cautella* 产卵，也可刺激交配后雌虫多产卵。从食物中摄取的 JH 降低了粉螟 *Plodia interpunctella* 的召唤行为，从而减少了交配。

Moshitzky 等（1996）将黄猩猩果蝇性肽注入处女雌蝇中，刺激了 JH 的产生、排卵和产卵，同时抑制了再交配。

### 2.2 性肽刺激棉铃虫交配后行为的模式研究

棉铃虫雌蛾性信息素的产生由暗期节律性释放的 PBAN 控制，交配后 PBAN 释放立即终止。雄性附腺分泌物激发这一作用。交配后第二夜又产生性信息素。可见雄性附腺分泌物的作用是暂时性的。交配可使棉铃虫和美洲棉铃虫召唤行为停止，性信息素产生降低，但交配后雌蛾的离体性信息素分泌腺可接受 PBAN 的刺激。同时，交配后的美洲棉铃虫和烟芽夜蛾，若注射咽下神经节匀浆液或 PBAN，又可恢复产生性信息素。

Fan 等（1999）将黄猩猩果蝇的性肽注射到处女棉铃虫体内，刺激后者的咽侧体活性提高，合成了大量保幼激素，体内离体均可抑制性信息素的产生，但却不能抑制召唤行为。根据以上结果，Fan 等认为，在棉铃虫中，性肽类的物质随交配进入雌蛾体内后，具有两个作用靶标，一是性信息素分泌腺，直接抑制性信息素的生物合成；另一是咽侧体，刺激保幼激素的产生。

## 3 交配影响雄虫附腺分泌物再合成的激素途径

雄性黄猩猩果蝇在每次交配后，将附腺分泌物的 1/3 输送给了雌蝇。因此，必须快速合成这些物质以补充消耗，为下次交配作准备。Dibenedetto 等（1990）证实，交配刺激了黄猩猩果蝇雄性附腺细胞的活性，不仅使 mRNA 量增加，而且 mRNA 翻译成蛋白质的生化反应也异常活跃。采用转基因技术将黄猩猩果蝇雄性附腺蛋白启动子与编码 β-半乳糖甙酶的碱基序列融合，将此基因再转入果蝇内而形成了转基因果蝇。当这种果蝇交配之后，β-半乳糖甙酶即大量合成，表明交配刺激了雄性附腺蛋白的转录（Simmerl 等，1995）。

尽管以上结果给出了交配刺激附腺蛋白基因再表达的直接证据，但却无法证明是来源于求偶行为还是交配本身的刺激信号。Herndon 等（1997）采用微灼烧技术封闭了雌蝇的交尾孔，然后将成熟雄蝇放入，使雄蝇能进行正常的求偶活动，但不能交配。结果表明，求偶并不刺激雄性附腺蛋白的合成，只有在交配过程中雄性附腺蛋白的输出，才能刺激附腺蛋白基因的再表达。

为了进一步弄清雄性附腺蛋白的输出怎样刺激其基因的再表达，Herndon 等（1997）进一步用激素处理成熟雄蝇，结果表明 JH 类似物蒙 515 的 1 次处理，使熔合基因 Acp95EF-lacZ 的产量增加了 40%，与未处理对照差异极显著。采用保幼激素 III 处理得到了类似的结果。同样，蜕皮素处理 1 次导致 Acp95EF-lacZ 产物增加率 40%。当两种激素同时应用，Acp95EF-lacZ 的产量则增加 80%，若连续使用蒙 515 两次，增加率为 70%。交配 1 次增加率达约 40%，连续两次交配增加率则达 50%。可见，保幼激素和蜕皮激素单独应用，均可刺激雄性附腺蛋白的表达，若两者同时应用，刺激作用更为明显。

其他昆虫的研究表明，内部器官的膨胀，可刺激咽侧体合成保幼激素。雌性 *Diploptera punctata* 接受精包后，交配囊的膨胀激活了咽侧体，而保幼激素的分泌又进一步刺激卵发育。精包的刺激仅为机械信号，若用玻璃珠替代精包，具有同样的生理效应。血餐使吸血蝽的腹部膨胀，激活咽侧体合成保幼激素。在雄虫中，排空的雄性附腺信号也可能作为激活激素释放的刺激源，而高滴度的激素则顺次刺激雄性附腺蛋白的再合成。

很多试验结果证明，保幼激素可刺激雄性附腺蛋白的合成。Wigglesworth 将吸血蝽去头后，由于咽侧体被同时移去，雄性附腺蛋白停止积累。移去昆虫的咽侧体也可停止附腺蛋白的合成，其效应可被咽侧体的再置入或保幼激素及其类似物的应用恢复。

通过比较由保幼激素直接控制合成的两种飞蝗卵黄蛋白基因和一种蟋蟀的卵鞘蛋白基因的上游序列发现，它们都具有保幼激素结合区，此区包含 AAGGGTTC 共 8 个碱基。在黄猩猩果蝇中，雄性附腺蛋白 Acp95EF 和 Acp57Da 的基因上游也具有相似的包含 8 个碱基的序列 TTGGGTTC，表明这两个基因也在转录水平由 JH 直接控制。而在果蝇的其他雄性分泌蛋白，如 Acp26Aa 和性肽基因的上游，却未能发现相似的碱基序列。这可能是由于 Acp26Aa 和性肽基因克隆时，克隆出的上游序列的碱基长度不够，从而未能包含 JH 结合序列，因为这一结合序列可远离转录起点达 400 个碱基。

除保幼激素外，其他激素也可影响雄性附腺蛋白的合成。部分切除吸血蝽脑部的神经分泌细胞，可抑制雄性附腺蛋白的积累，保幼激素的应用只能部分消除这种抑制。蜕皮激素不仅参与控制雄性附腺的发育，在有些昆虫中，还直接控制雄性附腺蛋白的合成。

Yamamoto 等（1988）将离体雄性附腺与 JHIII 一起温育，与对照相比，JHIII 显著刺激了附腺蛋白的合成，而离体雄性附腺与蜕皮激素一起温育时无活性。这一结果无法说明 JHIII 刺激的是转移至雌体的雄性附腺蛋白种类，还是居留种类。比较这一结果与 Herndon等（1997）的试验结果可知，蜕皮激素的生理效应不同，这也许是在 Yamamoto 的离体体系中，缺少蜕皮激素刺激雄性附腺的中介因子，或者在果蝇体内蜕皮激素通过激活其他器官，由后者刺激雄性附腺的生物合成。从以上离体和活体试验结果可知，保幼激素和蜕皮激素是通过不同途径激活雄性附腺蛋白基因再表达的。

# 第八节　展　　望

## 1　交配后行为和生理变化的进化假说

交配后雌虫的行为和生理变化均可增加与之交配的雄虫的繁殖成功率。如交配后产卵量陡升，可使雌虫的后代在短期内大量繁殖，从而增加与之交配的雄虫的基因在后代中的表达频率。此外，由于后续交配在多数昆虫中可替换雌虫受精囊中原有的精子，因此，交配后雌虫在一定时间间隔内拒绝接受再次交配，也有利于与之交配的雄虫精子的有效利用。而寿命缩短也许是输入的精液在行使其有利功能时带来的负面影响。但即便如此，交配后雌虫的寿命仍长于产下全部卵所需的时间。

雌虫接受雄性附腺分泌物刺激而产生行为改变的好处尚不清楚，可能这些物质给了雌虫已接受了有效精子的信号，从而避免产无效卵，而且，在保证足够的精子的前提下，减少交配还可降低精液对雌虫的毒害。但另一方面，减少交配次数也降低了雌虫与具有更优秀精子的雄虫交配的机会。同时，交配次数的减少也部分剥夺了雌虫从精液中获取营养的机会。此外，由雄性附腺分泌物抑制的交配使雌虫后代的基因多样性降低，而两性生殖的主要目的就是通过雌雄之间基因的重组增加基因多样性。就这点而言，雄性附腺分泌物抑制雌虫的再交配显然不利于雌虫的后代。

通过以上比较，Eberhard（1996）认为，雄性附腺分泌物对雄虫有利，而对雌虫，则弊大于利。因此就雄虫而言，雄性附腺分泌物可能作为一种抑制雌虫再交配的手段而被进化；就雌虫而言，则摆脱或降低这种控制更有利于后代。这种追随进化肯定会导致雄性附腺分泌物种类多样，进化迅速。实际情况也确实如此。

Immamura等（1998）的研究结果表明，在 *D.biarmipes* 雄性个体中，至少存在着两种不同的刺激雌蝇排卵的肽。雄性分泌蛋白的这种多样性也由 Ohashi 等（1993）和 Schmidt 等（1993）在近缘种 *D.suzukii* 中证实。在黄猩猩果蝇中，除性肽外，另一种附腺分泌蛋白，Acp26Aa，与软体动物 Aplysia 的产卵刺激激素在一区段相似，也可刺激产卵。此外，顺-11-十八碳烯醇乙酸酯及酯酶 6 的共同输入雌蝇，又提供了控制雌蝇交配后行为的另一条有效的途径。随着研究的深入，应不难发现大量具有相似功能而变异很大的雄性分泌蛋白及其他分泌物，在交配过程中输入雌虫体内，引起雌虫交配后行为。

## 2　后续研究的重点

成功的繁殖是昆虫为害的基础。了解交配后雌虫行为和生理的变化以及引起这些变化的刺激因子具有重要的理论和实际应用价值。果蝇的遗传背景和转基因技术在所有昆虫中研究得最全面和深入，因而应用果蝇来从事这项研究无疑为揭示引起这些变化的分子、基因和机理的内在联系提供了极好的研究材料。

对果蝇的研究成果表明，这些变化分为起始但短暂的变化和长期变化。前者主要由雄性附腺分泌物引起，后者则主要由受精囊内精子的数量所决定。

引起交配后雌蝇早期行为和生理变化的雄性附腺分泌物包括：激素原 Acp26Aa 和性

肽加快交配后雌蝇产卵；性肽使交配后雌蝇拒绝再次交配。几种与精子贮存和竞争有关的附腺分泌蛋白也已初步确定，其中的一种名为 Acp36Dc 的蛋白，在交配后短间隔期内可将进入受精囊的精子关住，以阻止后续交配精子的替代。

利用果蝇对交配后雌蝇行为和生理变化机制的后续研究也可分为短期和长期两个阶段。

短期研究包括：①分离和鉴定出更多的雄性附腺分泌蛋白，通过对附腺凝胶电泳蛋白图谱和重新分离附腺分泌蛋白基因的频率估算，目前已分离和鉴定的 16 种蛋白质和肽类只占附腺分泌蛋白的 10%～50%，尚未被鉴定出的雄性附腺分泌蛋白还很多。②确定各种雄性附腺分泌蛋白的生理功能，如导致交配后雌蝇寿命缩短的蛋白，加快产卵和拒绝再交配的所有蛋白种类。③鉴定出这些雄性蛋白后，其中具有组织和性别专化性的种类，可为激素调控和生殖生理的研究提供识别标记。总之，在后续短期研究中，应集中回答以下问题：雄性分泌蛋白进入雌蝇后，是在何处通过何种途径进入血液循环系统的？是雌蝇体内进行的酶解反应激发了雄性分泌蛋白的活性吗？若是，雄性分泌蛋白的活性直到交配后才被激发，又具有怎样重要的生理学意义？雄性分泌蛋白的最终靶标是什么，它们是怎样到达这些靶标的？雄性分泌蛋白通过何种分子途径行使其功能，它们是怎样影响精子的？而雄性附腺分泌蛋白通过怎样的神经中介影响交配后雌蝇的行为则显得非常重要。

就长期研究而言，雄性附腺分泌蛋白的了解，对于研究整体范围内的激素活动和行为、品系和物种的分化及进化均非常重要。此外，雄性附腺分泌蛋白的特异性功能和作用机制的阐明以及干扰物质的寻找，为农药作用新靶标及新农药的开发奠定理论基础，又具有重要的实际应用价值。近几年，研究结果表明果蝇发育程序的分子调控途径相当保守，对果蝇和脊椎动物而言，虽然起始因子和最后的形态变化千差万别，但中心环节却相当保守。可以预料，以果蝇为材料研究出的雄性附腺分泌蛋白对交配后雌蝇行为和生理影响的分子机制模式，必将适应于其他昆虫，因而这一研究成果可能具有广泛的代表性。

# 第十二章 昆虫产卵的化学调控

引起昆虫产卵行为改变的化学物质很多，按其作用结果可分为4类：引诱剂（attractant）、刺激剂（stimulant）、忌避剂（repellent）和抑制剂（deterrent）。对这4类物质的划分，Dethier等（1960）早就指出，产卵引诱剂和忌避剂诱发昆虫对产卵场所或资源的定向运动，前者引起正趋向性，而后者则引起负趋向性；产卵刺激剂和抑制剂则是指昆虫接受到这些物质的刺激后，改变产卵行为和数量，前者刺激昆虫的产卵行为，使卵量增加和（或）产卵频率加大，后者则阻止了本应产卵的昆虫的产卵行为，从而使卵量减少和（或）产卵频率减小。

## 第一节 昆虫信息素对产卵的影响

昆虫为了标记自己占领的资源，常分泌分散信息素［spacing (epideictic) pheromone］于这些资源上。分散信息素存在于卵、幼虫或成虫上，用以阻止进入这一领域的同种其他个体，有的甚至用以驱散不同种个体。在后一种情形下，这些分泌物应称为利己素。产卵忌避信息素（ORP）和抑制信息素（ODP）是一类分散信息素。

### 1 产卵忌避信息素和抑制信息素

许多研究结果表明，昆虫能通过接受产卵忌避剂（ORP）和抑制剂（ODP）来识别已被占领的食物资源。在某些昆虫中，此类信息素能阻止同种个体在已被占领的食物资源上停留或取食；在另一些昆虫中，则能阻止雌成虫在同一位置再次产卵。

早在1937年，Wiesman就观察到欧洲樱桃实蝇产卵均匀分布现象。1953年，Haefiger则推测这种信息的传递可能是由某种

化学物质来完成的。Yoshida（1961）第一次证明了ODP的存在。Prokopy等（1972）通过对苹果实蝇的研究，进一步证明了ODP的存在，并指出了ODP在综合防治中的潜在应用价值。Katsoyannos（1975）指出此类信息素能在自然条件下长期保存及其原因，并阐述在实验室中收集ODP的方法。目前ODP在许多昆虫中相继发现。据Prokopy（1981）统计，已发现6个目，16个科中的35种昆虫能释放ODP，其中至少有29种昆虫确证存在ODP。

### 1.1　双翅目昆虫

由于实蝇幼虫一直生活在同一果实内直到发育至成虫而不能转移，故当同一果实内幼虫数目过多时，便会因营养不足而影响发育。研究表明，雌实蝇总能避免在同一果实上重复产卵。

欧洲樱桃实蝇产卵分布十分均匀，推测可能有化学物质参与。Boller等（1971）的室内试验表明，预先接触过产卵雌虫的人工产卵装置对雄蝇有明显的诱捕效果。欧洲樱桃实蝇能通过跗节上的D-毛识别ODP。

Boller等（1975）在樱桃园的小规模实验表明，喷洒了ODP的处理和对照相比，有1个或多个产卵刺痕的樱桃分别占24.3%和66.1%，防效63.2%；收获时所检查的样品中的有蛹的樱桃数分别占9.6%和42.9%，防效达77.6%。1976年的田间试验结果进一步证实了ODP田间的有效性。

欧洲樱桃实蝇的ODP主要活性成分低挥发性、高极性，在沸水、1mol HCl或1mol NaOH中稳定。

苹果实蝇是人们发现有这种现象的较早的实蝇（Prokopy，1972）。这种雌蝇及其至今已研究的所有其他释放标记信息素的实蝇都在产卵后把产卵器在苹果表面拖动，同时释放信息素，后来者与该果实上的信息素接触后，就会拒绝在上面产卵。果实越大，雌蝇碰到标记信息素的机率越小，产卵越多，但随着在忌避作用发生之前产卵器拖动回数的增多，标记信息素浓度和覆盖面增大，产卵活动最终被抑制。故相比小果实而言，大果实上产下了更多的卵，发育出了更多幼虫。对苹果实蝇的另一个寄主山楂果而言，果实只能供养1个幼虫到成熟，苹果实蝇产生ODP避免重复产卵则更为必要。此外，苹果实蝇雄蝇对ODP也有反应。由于ODP的存在，表明雌虫正在附近，这引起雄蝇聚集，刺激它们在附近飞行，寻找雌性伴侣。

Prokopy（1971）的研究结果表明，苹果实蝇的ODP高极性，低挥发性，部分溶于丙酮，在沸水中呈热稳定性，在1 mol NaOH或1 mol HCl中表现稳定，是1种多组分的混合物。这些特性与欧洲樱桃实蝇的ODP非常相似。

室内生测试验表明，苹果实蝇的2龄及3龄幼虫及它们的粪便、蜕以及它们爬过的地方，对雌成虫产卵都有明显的抑制作用。

还有一些蝇类害虫由成虫分泌或幼虫释放产卵忌避信息素，这些种类如苜蓿斑潜蝇（Quiring，1982）、种蝇（*Hylimya* spp.）（Zimmerman，1979）和高粱芒角蝇（Raina，1981）等。

生活着伊蚊幼蚊的水减少了成蚊的产卵（McCrae 1984）；同样，高密度的*A.atropalpus*

幼蚊（900头/L）生活的水也阻止了成蚊的产卵作用（Maire 1983）；库蚊（*Culex tritaeniorhychus*）幼蚊也具有相似作用（Reisen et al，1978）。这是由于产卵抑制剂的存在还是过量排泄物的作用仍需进一步研究。

## 1.2 鳞翅目昆虫

地中海粉螟幼虫能散布1种产卵忌避信息素。Corbet（1971）报道这种信息素存在于来自幼虫上颚腺的液滴中，在幼虫头与头相遇时分泌出来。这种信息素不但忌避产卵，而且还引起幼虫逃离含有这种高浓度信息素的区域。Corbet（1973）还发现，无论幼虫密集程度如何，食物总是多余的。他进一步证实，用无营养价值，但又无毒的木屑把食物"稀释"，使幼虫的生活空间扩大1倍，会导致幼虫生长速度提高，可能是因为这样做减少了幼虫间相遇的机会，或者减少存在于虫粪中的生物或非生物有毒物质所造成的不利影响。这一证据表明，幼虫在高浓度的上颚腺信息素作用下发生扩散。

Corbet等（1971，1973）的研究还表明，地中海粉螟幼虫散布的这种产卵忌避信息素在低浓度时，反而刺激成虫产卵。低浓度产卵忌避信息素可能是食物适宜、密度合适的信号，这正是成虫寻找的理想产卵场所。

由成虫分泌或由幼虫释放产卵忌避信息素的还有为害谷类和其他贮存产品或玉米的5种螟蛾，包括斑粉螟、可可粉螟、印度谷螟（Mudd et al，1973）和欧洲玉米螟（Dittrick et al，1983），1种夜蛾（*H.bicruris*）（Brantjes，1976），普累西斑蝶（Dixon等，1978）和 *Anthocharis cardamines*（Dempster，1992）。

对大菜粉蝶和菜粉蝶（Rothschild et al，1977；Behan et al，1978；Den Otter et al，1980；Schoonhoven et al，1981）的研究表明，产卵抑制信息素存在于两种蝴蝶的卵上和附腺中，含有挥发性化学物质和非挥发性化学物质。前者由触角上的嗅觉器感受，后者则由跗节上位于每个跗分节上的β-毛感受器直接感受。几年的研究结果纯化到这类ODP，这是几种新的肉桂酸衍生物。

大菜粉蝶除了雌虫产生ODP外，取食的幼虫也能阻止成蝶产卵。这是幼虫产生的另1类ODP，还是受害植物释放的抗性物质，仍需进一步研究。

对灰翅夜蛾（*Spodoptera littoralis*）的研究表明，饲喂于棉叶上的幼虫对同种雌虫表现很强的抑制作用，而棉叶提抽物却无任何抑制活性，表明活性化合物或化合物的活性浓度由幼虫产生（Hilker，1985，Klein等1990）。从幼虫粪便中分离出15种化合物（表12-1），生测结果表明这些化合物的混合物表现了很强的抑卵活性。

Anderson等（1993）采用逐步减少成分的方法，根据测定出的这15种化合物的比例，选取合成化合物配制了10种混合物（SM1～SM10），表中具有+号的化合物在混合物中具有。从表中可知，全成分混合物SM1表现出最大的抑卵活性。在选择性试验中，仅有20%的卵块产在处理上。去除5种挥发性酮，混合物SM2仍显著抑制产卵。进一步去除脂肪族的醛类，混合物SM3仍具有显著的抑卵活性。但当继续去除苯甲醛（SM4），或所有单萜类（SM5），或任何一个萜（SM6～SM10），抑卵活性随之消失。可见，表现抑卵活性的包括苯甲醛和5种萜烯（香芹酚、丁香油酚、橙花酚、植物醇和百里酚）。这6种化合物具有协同作用，缺少任何1种，其活性大大降低。

**表 12-1 测定混合物对灰翅夜蛾雌蛾的产卵刺激**

| 化合物 | SM1 | SM2 | SM3 | SM4 | SM5 | SM6 | SM7 | SM8 | SM9 | SM10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 酮 | | | | | | | | | | |
| 1-避蚊酮 | + | + | | | | | | | | |
| 2-戊酮 | + | + | | | | | | | | |
| 2-甲基-3-戊酮 | + | | | | | | | | | |
| 3-甲基-2-戊酮 | + | | | | | | | | | |
| 2-甲基环戊酮 | + | | | | | | | | | |
| 1-羟基-2-丙酮 | + | | | | | | | | | |
| 苯乙酮 | + | | | | | | | | | |
| 醛 | | | | | | | | | | |
| 苯甲醛 | + | + | + | | + | + | + | + | + | + |
| 正壬醛 | + | + | | | | | | | | |
| 正癸醛 | + | + | | | | | | | | |
| 萜烯 | | | | | | | | | | |
| 丁香油酚 | + | + | + | + | | + | + | + | + | |
| 百里酚 | + | + | + | + | | + | + | + | | + |
| 香芹酚 | + | + | + | + | | + | + | | + | + |
| 橙花酚 | + | + | + | + | + | + | | + | + | + |
| 植物醇 | + | + | + | + | + | | + | + | + | + |
| 生物活性 | | | | | | | | | | |
| 测定成分（卵块占%） | 20.0 | 25.0 | 29.4 | 40.6 | 48.4 | 45.2 | 42.3 | 34.3 | 50.0 | 56.0 |
| 对照（卵块占%） | 80.0 | 75.0 | 70.6 | 59.4 | 51.6 | 54.8 | 57.7 | 65.7 | 50.0 | 44.0 |
| 差异显著性 | 显著 | 显著 | 显著 | | | | | | | |

Anderson 等（1993）对灰翅夜蛾单感受器电位测定结果表明，在触角上具有 5 种萜烯的嗅觉感受器，其中丁香油酚和橙花酚还具有专一性嗅觉感受器（表 12-2），从而进一步证实了这 6 种化合物的重要信息功能。

**表 12-2 灰翅夜蛾触角上感受器数目**

| 刺激源 | 触角上感受器数目 |
|---|---|
| 香芹酚、百里酚和丁香油酚 | 5 |
| 香芹酚 | 2 |
| 橙花酚 | 2 |
| 百里酚 | 1 |
| 植物醇 | 1 |
| 正壬醛 | 1 |
| 正癸醛 | 1 |

抑卵活性物质还存在于 *Spodoptera* 属的其他种幼虫中。如在草地贪夜蛾中，Williams 等（1986）发现其抑卵剂至少由 2 种物质组成，其中 1 种由幼虫产生，另 1 种则起源于植物，由幼虫取食刺激植物释放。在甜菜夜蛾中，存在于幼虫粪便中的抑卵剂可能来源于植物本身。因为植物的匀浆液也同样具有刺激作用（Mitchell 等，1985）。

欧洲玉米螟的卵上也含有产卵抑制信息素：棕榈油酸甲酯、棕榈酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯和硬脂酸甲酯（每卵块含量分别为 0.22、0.29、0.22、0.26 和 0.02$\mu$g）的混合物。这 5 种物质也具有明显的协同作用，只有同时以一定比例存在时，才具有明显的抑卵作用（Thiery et al，1991）。类似的甲酸酯混合物也存在于小卷蛾（*Lobesia botrana*）

中（Gabel et al，1992；Thiery et al，1992）。同样，*Anthocharis cardamines*（Dempster，1992）的ODP也决定着卵在寄主上的分布。

美洲棉铃虫幼虫粪便中含有ODP，沉积于卵块上面和卵块附近的雌虫鳞片也含有ODP。

### 1.3 鞘翅目昆虫

Yoshida（1961）、Oshima等（1973）和Wasserman（1981）以绿豆象和四纹豆象为材料进行的试验表明，在产卵过程中，雌虫在种子表面留下1种标记信息素以避免在该粒种子上重复产卵。两性个体都含有这种信息素，但是雌虫所释放的量大得多。这种信息素对种群的影响表现在：卵在可用种子间的分布是均匀的，因而较少出现幼虫为了竞争1粒种子内的有限资源而导致不良效应的现象（Mitchell，1975；Giga et al，1981）。巴西豆象（Umeya，1966）和大豆象（Szentesi，1981）也有类似现象。

云杉花黑天牛在产卵后，从产卵器分泌出一些胶状物，覆于卵上，并用尾部粘上胶状物在产卵孔附近涂布。云杉花黑天牛拒绝在已产过卵的松树短枝上再产卵，而对具有自己挖掘的产卵孔和人工挖掘的模拟产卵孔却表现出相同的产卵行为。表明了产卵抑制剂的存在（Anbutsu et al，1997）。此外，烟草甲（*Lasioderma serricorne*）也具有产卵抑制剂（Kohno et al，1986；Imai et al，1990）。

对有些昆虫来说，某一单个资源可能不仅作为成虫产卵和幼虫发育的场所，而且还为成虫提供食物并作为它们的交尾场所。拟谷盗和小蠹就是开发利用这种资源形式并借助化学信息物质防止过度拥挤的两大昆虫种群。Alexander等（1943）、Loconti等（1953）、Naylor（1959，1961）以及Faustini等（1980）的研究表明，赤拟谷盗和杂拟谷盗成虫产生并（在淀粉中）释放醌类物质，有效地忌避同种其他雌虫在这一场所取食、交尾和产卵。与此相似，生活于树木或木材中的松小蠹属成虫，当密度达到一定程度时，它们释放马鞭草烯酮和反-马鞭草烯酮，抑制其他成虫进入这一部位取食、交尾和产卵。齿小蠹属成虫在高密度时也具有相似行为（Wood，1982）。间接的证据表明，棉铃象甲也有这种信息素（McKibben et al，1982）。

### 1.4 膜翅目昆虫

缨小蜂（*Anaphes iole*）是豆荚盲蝽卵的专性寄生蜂，其寄主将卵产于植物组织内，仅使卵帽外露。室内生测结果表明，*A. iole*产卵于寄主卵内之后，用腹尖在卵帽上拖动，标记寄主卵多次，并重复检查以确定是否被标记上。只有确信寄主卵被标记后才离开。当*A. iole*遇上被标记的卵后，通常拒绝再产卵，多数个体重新对此标记卵进行标记，以增加标记物浓度，从而避免被标记卵再次被寄生（Eric et al，1997）。显然，标记过程释放了每类信息物质。

广赤眼蜂是1种产卵在鳞翅目卵内的寄生性昆虫，幼虫在1个寄主内完成发育。每个寄主卵所含营养仅能保证有限数量（通常为1头）的幼虫需要。Salt（1934）证实其成虫能识别它的寄主麦蛾卵是否已经被寄生。随后进一步证明成虫的这种识别能力依赖于已被寄生的寄主卵上的信息素标记物（Salt，1937）。行为观察发现，广赤眼蜂通过接触就会

拒绝接受已被寄生的寄主，但是如果这些寄生卵被淋洗过，它就只有在把产卵器插入卵内后才拒绝它们。可见，广赤眼蜂产卵后在寄主卵上遗留的标记物包括两种类型：一种是由成虫标记在寄主卵表面，可以在一定距离内由触角感受的；另一种是在产卵时通过内部标记，可以由产卵器接触感受的。Guillot 等（1972）也观察到相似的现象：*Campoletis sonorensis* 用1种信息素标记它的寄主，这种信息素在其他个体的产卵器插入寄主之前就可以感受到。6h 以后，被标记的寄主又重新激发拟寄生物的产卵器插入行为，但解剖观察表明，寄主中并没有新增加的卵。

已有人对仅发生在拟寄生作用后期以及产卵器刺入之后的寄主鉴别情况作了报道。Fisher 等（1970）指出，寄主在被寄生数天后，血蛋白发生变化，而且这种变化可能与拟寄生物的内部鉴别能力有关。Guillot 等（1972）也列举了这样的事实，*C. sonorensis* 向寄主注射一种卵巢因子，后者有助于拟寄生物对寄主进行内部鉴别，但这一因素如何起作用还不知道。关于内部标记因素特异性问题的少数研究（Wylie，1971）表明，这些因素没有种的专化性。与此相反，许多研究表明，用于外部感受的标记信息素则有种的专化性（McLeod，1972；Ables 等，1981）。

研究表明，沟茧蜂、红尾茧蜂和 *Campoletis sonorensis* 的外部标记信息素来源于杜氏腺（Vinson et al，1972；Guillot et al，1972）。腺内的碳氢化合物可能是红尾茧蜂的标记信息素。

### 1.5 脉翅目昆虫

脉翅目昆虫中见于报道的只有草蛉。草蛉（*C. oculata*）怀卵雌虫的产卵可被初孵幼虫产生的ODP强烈抑制。室内将用于草蛉产卵的滤纸先让10个初孵幼虫爬行15min到8h，再测定怀卵草蛉在这些处理过的滤纸上的产卵量。结果表明，被幼虫爬行了15min的滤纸上的落卵量极显著低于空白对照。幼虫爬行的时间越长，抑制作用也越强，爬行30min的滤纸上落卵量极显著少于对照。但爬行30min至爬行8h的滤纸，抑卵效果的差异不再显著（Ruzicha，1997）。

为了测定 *C. oculata* 初孵幼虫 ODP 的热稳定性，将用于产卵的滤纸先让10个幼虫爬行4h后，放于30～200℃的恒温下1h，然后测定抑卵活性。结果表明，当温度不高于140℃时，对抑卵活性无影响，150℃抑卵活性开始下降，但与未高温处理的对照差异不显著，至170℃时抑卵活性才完全失去。表明ODP非常稳定，不会由于夏日的高温烈日而很快失活。

将幼虫爬行4h的用于产卵的滤纸放于加盖的培养皿中30天，抑卵活性并无变化，放置120天的滤纸在双向选择性试验中（处理和对照）落卵量仅10.7%，150天的仅24.6%。同样，幼虫爬行了8h的用于产卵的滤纸在加盖培养皿中放置98～100天，落卵量仅6.6%。可见，*C. oculata* 幼虫分泌的ODP在常温下非常稳定。

将初孵幼虫爬行4h的用于产卵的滤纸，在室内敞开放置3～4星期后，抑卵活性便显著下降，敞开放置96～98天的滤纸，抑卵活性便完全消失。表明 *C. oculata* 幼虫分泌的ODP是挥发性的。

将用于产卵的滤纸放于装有幼虫并加盖的容器中，不使幼虫与滤纸接触，4或24h后

取出，这些滤纸也具有抑卵作用，活性大小与容器中幼虫数量和放置时间有关。这些滤纸在室内敞开放置5天仍可抑制成虫产卵，但放置10天后活性消失。

以上结果表明，*C.oculat* 幼虫分泌的ODP非常稳定，在田间足以保持到幼虫完成发育。同时，这类ODP也具有一定的挥发性，成虫不需降落便可感受到。

## 2 产卵引诱信息素和刺激信息素

对产卵成虫的引诱导致了雌虫的聚集，故产卵引诱信息素（OAP）常常又是雌虫聚集信息素。而卵量的集中，当然引起幼虫的聚集，故产卵刺激信息素（OSP）即使不引起成虫聚集，也引起了幼虫聚集。从这个意义上讲，任何引起雌虫聚集的信息素，其实都是产卵引诱信息素或产卵刺激信息素。

### 2.1 双翅目

许多事例表明蚊类的幼虫可分泌产卵引诱剂和刺激剂。Kalpage 等（1973）的室内试验表明，伊蚊（*Aedes atropalpus*）成蚊更愿意在同种幼虫生活过的水中产卵，即使将幼蚊放于无菌条件下饲养，结果也完全一致。这类物质很稳定，几个星期后仍具活性，蒸发掉水后，活性物质保留于残渣中。成伊蚊（*Aedes togoi*）也具有相似的产卵选择性，即使幼虫放入水中之前用高岭土清洁，生活过的水经滤菌处理，这种活性仍存在（Trimble et al，1980），表明这类活性物质是由幼虫分泌的信息素而非排泄物或菌类代谢产物。活性物质只有在成虫接触水后才表现促卵作用，可见其为接触刺激剂而非引诱剂。这类接触刺激剂的稳定性和低挥发性可使其即使在干旱条件下也能长久保持活性，当雨季来临时，使成蚊找到相同场所产卵，因此对种群的繁衍十分有利。库蚊（*Culex tersalis*）在饲育水中释放1种非挥发性物质，刺激雌蚊产卵。已交配的雌性埃及伊蚊受含同种未成熟幼虫饲育水的引诱而产卵（杜家纬，1986），冈比亚伊蚊（*A. gambiae*）的饲育水也具明显的促卵作用（McCrae A W R，1984）。

饲喂了 *Aedes triseriatus*4 龄幼虫 48h 的水，对成蚊产卵有显著的刺激作用。用高岭土洗肠的幼蚊生活过的水具有相似的作用。进一步的研究表明，这是一类低挥发性引诱剂（Bentley M.D et al，1976；McDaniel et al，1979），相似的事例还见于对其他蚊种的研究报告中（Michael D.B，1989）。

成库蚊（*Culex tarsalis*）偏爱产卵于具有同种蛹、蜕和初羽化成蚊的水中，而对生长 *Culiseta inornata*、*A. aegypti*、*Culex pipiens* 蛹的水无兴趣。活性物质低挥发性、高热稳定性，由接触化感器而感受，可能是1种具有种特异性的产卵刺激剂（Hudson A，1967）。成蚊的这种产卵偏爱性在 *Culex salinarius*、*A.aegypti*、*A.atropalpus*、*A.caspius* 和 *A.togoi* 等蚊种中均有报道（Michael D B，1989）。

*Culex quinquefasciatus* 成蚊喜爱产卵于含有其卵筏醚提取物的水中，活性组分为单羟基或双羟基脂肪酸与甘油形成的1，3-二甘油酯的混合物。此混合物与甲醇反应后得到的主要甲酯化脂肪酸为5，6-双羟基十六酸和3-羟基十四酸（Starratt A N et al，1973）。随后的报道认为，*C. quinquefasciatus* 成蚊产卵偏爱性与卵顶部微滴密切相关，不具种的特异性。用气质联用仪分析其主要组分为 erythro- 6-acetoxy-5-hexadecanolide，生测结果表明

卵筏上的促卵活性完全由此化合物引起。手性固定相气相色谱分析显示，此信息素构象为 (-) - (5R，6S)(Laurence et al，1982，1985)。对合成的4个旋光异构体进行生测，以 (-) - (5R，6S) 活性最高，证实了仪器的分析结果（Hwang et al，1987；Sakibara et al，1984）。

从 *C. tarsalis* 中生测到1种与卵筏有关的信息素。核磁共振分析表明，其为单羟基脂肪酸与甘油形成的1，3-二甘油酯，降解试验检测出脂肪酸为3-羟基十四酸、3-羟基十六酸、3-羟基十八-反-11酸和 erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide（Starratt et al，1972）。

蚋科的 *Simulium damnosum* 复合种雌蚋常聚集在同一地点产卵，卵块状。研究表明，这一行为是由产卵聚集信息素引起的。产卵聚集信息素分布于刚产下卵的表面，引诱其它怀卵雌蚋来产卵（McCall，1995）。对产卵聚集信息素的提纯和分析表明，产卵聚集信息素由两种化合物组成。这两个组分除存在于刚产下卵的表面外，还存在于怀卵雌蚋的卵巢内。蚋科中还有许多种类也具有聚集产卵的习性。这可能是由视觉的、触觉感受的非挥发性信息素和由卵散发的挥发性信息素共同作用的结果。在加拿大和英国，不同种的雌蚋也聚集在一起产卵，这表明产卵聚集信息素不具有种的专一性。

McCall等（1997）应用气相色谱法分析了属于 *Simulium damnosum* 复合种的6个种的雌蚋（*S. leonense*、*S. yahense*、*S. sanctipauli*、*S. squamosum*、*S. damnosum* 和 *S. sirbanum*）卵块上和卵巢内的产卵聚集信息素，结果表明，不论色谱条件如何，它们均在相同的保留时间具有两个相同的峰（峰A和峰B）。这一结果表明至少在 *Simulium damnosum* 复合种中，雌蚋使用相同的产卵聚集信息素引诱产卵。分析结果表明，在不同种的雌蚋卵巢内，两种成分的比例略有变化。从 *S. leonense* 的1∶4.1到 *S. squamosum* 的1∶6.7。但这些变化是否为各个种所特有的，仍需进一步研究。因为即使在同1种中，不同个体间这两个组分的比例也有变化。如在 *S. leonense* 中，不同重复间的比例范围从1∶3.1～1∶5.3不等（表12-3）。

**表12-3 *Simulium damnosum* 复合种的6个种产卵聚集信息素的比例**

| 种　名 | 产卵聚集信息素比例（A∶B） |
|---|---|
| *S. leonense* | 1∶4.1 |
| *S. yahense* | 1∶5.9 |
| *S. sanctipauli* | 1∶6.7 |
| *S. squamosum* | 1∶5.0～1∶5.9 |
| *S. damnosum* | 1∶4.8 |
| *S. sirbanum* | 1∶4.3 |

对不同日龄的雌蚋的测定结果表明，产卵聚集信息素由怀卵的卵巢中产生。这表明产卵聚集信息素只在需要的时候由体内合成。

质谱分析结果表明，峰A和峰B均只有碳氢碎片，峰A分子量为292u，分子式为 $C_{21}H_{40}$，具有1个甲烷基分叉，位于链末端，含2个不饱和键，1个位于17位，另1个不饱和键的位置不在甲烷基分叉基团之内。峰B分子量294u，分子式为 $C_{21}H_{42}$，具有1个甲烷基分叉，位于链末端，双链位置在甲烷基分叉基团之内。

*Simulium damnosum* 复合种的产卵聚集信息素仅由雌蚋产生，雄蚋的身体任何部位均未测出这两种化合物。这表明产卵聚集信息素与交配无关。但雄蚋是否被这些聚集素吸引到达雌蚋产卵地点，仍需仔细的观察。

对这两种化合物的生测结果表明，仅具有这两种化合物时，对雌蚋的引诱作用最强，若与卵集中的其他组分相混，则引诱活性大大降低（McCall，1997）。采用 *S. leonense* 卵巢的分离组分能够引诱 *S. yahense* 的雌虫，证实了气相色谱和质谱分析的结果。

毛蠓（*Lutzomyia longipalpis*）的卵上也具有这种产卵聚集信息素。Dougherty 等（1992）的研究表明，毛蠓的产卵聚集信息素由雌虫的附腺产生。

## 2.2　直翅目

Saini 等（1995）的研究表明，沙漠蝗卵囊内的泡沫状物质可引起怀卵雌蝗群集于卵囊周围并产卵。泡沫状物质的极性或非极性抽提物和蒸发物具有相似的刺激作用。这些物质刺激沙漠蝗触角后也记录到了显著的触角电位（EAG），进一步证实了刺激物质的存在。

Rai 等（1997）用气相色谱—触角电位联用仪分析了卵囊泡沫状物质蒸发物。结果表明，有两个组分（峰 1 和峰 2）可以激起触角信号。峰 1 和峰 2 在气相色谱柱中的滞留时间分别为 32.59 和 34.51min，柱温分别为 173℃ 和 182.5℃。峰 1 引起的触角电位总是强于峰 2。用气相色谱—质谱联用仪鉴定表明，峰 1 和峰 2 分别为 1-苯乙酮（acetophonone）1，2-二甲氧基苯（veratrole）。采用人工合成化合物经气相色谱和气相色谱-触角电位联用仪分析证实了质谱分析结果。采用这两种化合物进行生测，结果表明，它们均能刺激沙漠蝗产卵，在最佳浓度时产卵率达 70% 左右，与泡沫状卵囊蒸发物相似。将这两种物质以不同比例混合，均能显著刺激产卵，但两者相混无增效作用。

1，2-二甲氧基苯除刺激产卵之外，还可以和其他几种挥发物协同作用刺激成蝗聚集，因而是成蝗聚集素的主要成分之一。此外，1，2-二甲氧基苯还可和其他几种挥发物协同作用，促进沙漠蝗蛹的成熟。

Lauga 等（1977）也发现被飞蝗产卵的沙地对同种怀卵雌蝗具有显著的引诱和促卵作用，从而认为产卵雌虫释放 1 类具有引诱和刺激作用的挥发性信息素。

## 2.3　鳞翅目

Abernathy 等（1994）的研究结果表明，同种雌蛾的存在对美洲棉铃虫具有明显的促卵作用。单雌/笼饲养时处女蛾在前 8d 共产卵量 153.4 粒，而 2，5，10 雌/笼饲养的处女蛾分别达 600.2，549.6 和 535.2 粒/雌。日产卵量在第二天单雌饲养的便明显低于群养的，至 3 日龄时达显著差异。但总产卵量却无显著差异。测定性信息素含量表明，单养和群养雌蛾无明显差异。1，2，5 雌/笼的雌蛾 2 日龄时性信息素含量分别为 54.22，59.08 和 47.29ng/腺。Abernathy 等据此认为，处女蛾体内存在 1 种促卵信息素（OSP），雌蛾生活在一起时可促进产卵。但在促卵的同时是否也降低性信息素的合成或释放，由于本文仅分析了 2 日龄数据，故很难下结论。

## 2.4　鞘翅目

鞘翅目中许多种类的昆虫，常由雄性或雌、雄两性分泌一类信息素。这类信息素具有 3 个方面的功能：①刺激其他雄性和雌性个体聚集；②刺激聚集后个体的性活动；③刺激

怀卵成虫产卵。由于其最先表现的功能为刺激聚集，因而常被称为聚集信息素。

Kohnle 等（1987）报道，苯乙酮可引起山毛榉树皮甲（*Taphrorychus bicolor*）的聚集并刺激产卵。

### 3 产卵信息素的产生部位

Prokopy 等（1981）为了确定ODP产生部位，摘除了600个苹果实蝇雌成虫的生殖器和消化道进行淋洗，在水中超声处理和离心。对上清液进行习性测定，结果表明，中肠、马氏管、直肠腺、后肠和卵巢的抽提物14雌虫当量（FE）时均能引起明显的抑制效应，而唾液腺、前肠、翅囊和阴道、受精囊附腺、产卵器、血淋巴和除去消化道和生殖道的残体均不引起明显的抑制作用。跗节D毛的电生理测定证实中肠、马氏管和后肠是分泌ODP主要组分的部位，但在直肠腺或卵巢中均未发现ODP活性。成熟雌虫粪便中也具有ODP的活性。以上结果表明，ODP主要组分从中肠和后肠组织分泌到肠腔中，然后在产卵后通过产卵器拖动和排粪而释放出来。

对鳞翅目昆虫而言，成虫的产卵信息素一般存在于卵上，菜粉蝶的产卵信息素还存在于雌蛾附腺内。

双翅目昆虫的库蚊、蚋等，由卵巢产生卵信息素，产卵时分布于卵上。毛蠓则由雌性附腺产生并分泌产卵信息素。

## 第二节 棉铃虫产卵调控信息素

棉铃虫也和许多植食性昆虫一样，同种个体食物与资源竞争和同类相残的习性使它们之间必需保持足够的距离，雌虫通过鉴别同种卵或幼虫而避免过度拥挤。同时，密度相关的同种个体的行为（如扩散、迁飞和产卵等）又使它们具有发达的信息素联系，但这方面的研究甚少。昆虫促卵信息素和抑卵信息素（OSP和ODP）的通讯联系决定着田间卵量的大小和分布。大量研究资料间接证明棉铃虫也存在OSP和ODP。如从棉铃虫田间产卵的习性来看，雌蛾的产卵具有两个显著的特点：①散产。棉铃虫的卵绝大多数散产，田间调查结果表明，1代棉铃虫的绝大多数卵（90%）散产于小麦穗上，3、4代多数卵散产于棉株顶尖嫩叶正面。这表明在棉铃虫卵或成虫身体上存在ODP，使它们不在同种卵的附近产卵。②分布均衡。当棉田内棉铃虫密度大时，雌蛾便扩散到其他寄主作物上产卵，使其他寄主作物上的落卵量增大。就同1年而言，棉铃虫2代发生量较少，3、4代发生量大，导致棉铃虫在3、4代时在棉花上的落卵率比2代明显减少（1991年河北田间棉花上二代落卵率90.5%，3、4代仅49.3%和56.5%；1992年2、3和4代分别为88.8%、46.6%和60.7%；1993年分别为83.1%、44.9%和51.7%）；就不同发生量的年分而言，发生量越大的年分，在棉花上的落卵率越小。如河北1991年发生量较小，而1992—1993年连续大发生，但棉铃虫各代在棉花上的落卵率1991年却最大，这导致棉铃虫在大发生时在各种作物上的分布更趋均匀，同时为害多种其他农作物。如1992年受害较重的有小麦、玉米、高粱、谷子、大豆、绿豆、菜豆、花生、番茄、茄子、芝麻、向日葵、南瓜等几十种作物。

但对棉铃虫OSP和ODP的研究却很少，仅有的1例报道是中国农业大学张青文等，他们在1996年曾报道在棉铃虫幼虫粪便和卵上均具有ODP，产卵忌避率分别达到了52.3%和88.06%，但这一研究并未指出是以带卵纱布作为抽提对象还是以卵作为抽提对象的，故很难确定ODP是存在于卵上还是存在于纱布上。即便如此，这些统计数字也提示我们，确实存在产卵抑制信息素，值得深入研究。

## 1 促卵信息素的存在

### 1.1 不同饲养密度对棉铃虫产卵的影响

李国清等（1998）室内测定结果表明，10对饲养蛾产出90%卵量只需7.2d，单对饲养蛾则需12d，群养蛾产出90%成熟卵比单养提前5d。10对饲养蛾在2日龄时产卵量达145粒/雌，是单对饲养蛾的4倍，直至5日龄，产卵量仍明显高于单对饲养的。由于单对饲养蛾与10对饲养蛾饲养空间比为1:0.64，每雌占有空间差异不大，且每天更换糖水保证了饲养笼中具有充足的新鲜食料，这种差异不是饲养条件所致，而是由于其他蛾的存在促进了产卵。同样的结果也由Rella L.A.等（1994）在美洲棉铃虫上得到，其结果表明，单养处女雌蛾在第一周的产卵量仅为2、5和10雌/笼的单雌产卵量的1/3，差异极为显著。Navasero等（1993）亦有过烟芽夜蛾在具有同种卵存在的叶尖上产卵量增大的报道。Rella认为有1种促卵信息素存在于雌蛾之中，同种雌蛾生活在一起时会相互促进。

为了测定群体饲养条件下的促卵作用是源于雄蛾还是雌蛾，比较了同一果酱瓶内饲养单个处女雌蛾和两个处女雌蛾的产卵结果。双雌饲养条件下雌蛾的产卵高峰日明显提前，在4日龄时即达115粒/夜，显著地高于单雌饲养条件下雌蛾（60粒/夜）。产下50%卵和90%卵所需天数在双雌饲养条件下分别为7.5d和12.0d，明显早于单雌饲养条件下的雌蛾（分别为8.4d和16.8d）。双雌饲养条件下的处女雌蛾每雌产卵量比单雌饲养条件下的高出约18%，差异达显著水平。可见，双雌饲养条件具有明显的促卵作用，这种促卵作用可能来源于促卵信息素或另1雌蛾的行为刺激。

采用大瓶和小瓶（体积为大瓶的一半）饲养单头处女蛾，结果表明，小瓶饲养具有明显的促卵作用，使产卵高峰提前到来，产卵量明显增加，增幅达45%以上，大瓶饲养的处女蛾产卵前期为1.8d，显著长于小瓶饲养处女蛾的产卵前期（1.0d）；产卵蛾率也以小瓶饲养蛾为高，在2日龄时达显著差异，其余日龄时虽在95%置信限时无显著差异，但除7日龄外，均在90%置信限时差异显著。若OSP果真存在，考虑雌虫间分泌量差异不大，则小瓶中浓度要高得多，这也许是小瓶饲养具有促卵作用的原因。

### 1.2 棉铃虫整体蛾丙酮提取液的促卵活性

采用新疆品系和山东品系棉铃虫整体蛾丙酮提取液处理饲养瓶和产卵纱布的方法，测定提取液对产卵的影响，共进行了3次生测试验。结果表明，无论是初羽化蛾、产卵盛期蛾，还是衰老蛾，其整体丙酮提取液对处女雌蛾均具有明显的促卵作用。处理后处女雌蛾的产卵高峰提早1～3d，产卵前期明显缩短，产卵量明显增大，最大增幅达97%，最小增幅也达14%。

## 2 促卵信息素分泌腺的定位

用丙酮浸泡蛾体不同分离部位，以产卵高峰出现时间、产卵量和产出50%和90%卵所需天数为指标，生测提取液促卵活性。采用逐步缩小范围的方法，分步确定分泌腺的着生部位。结果表明，雌蛾的前、中足的腿节和胫节具有明显的促卵作用。前足和中足腿节提取液使处女蛾的产卵量增幅分别达45%和41%，产下50%卵分别提早0.5和1.6d，产下90%卵分别提早0.5和2.2d；同样，前足和中足胫节提取液使处女蛾的产卵量增幅分别达15%和36%。同样方法检查雄蛾，得到了与雌蛾一致的结果。前足和中足腿节提取液使处女蛾的产卵量增幅分别达43%和41%，前足和中足胫节则为51%和45%。由于未对分离的后足腿、胫节进行提取和生测，故无法确定后足的腿、胫节是否具有相同的促卵作用。

## 3 抑卵信息素的存在及分泌腺定位

饲养于果酱瓶内的棉铃虫雌蛾在内壁上涂有1层分泌或排泄产物，采用换瓶和不换瓶饲养的方法测定其对棉铃虫产卵的影响。结果表明，换瓶有显著的促卵作用，使产卵高峰提早，峰值增大，产卵量极显著高于不换瓶的处女蛾，增幅达74%。可见，果酱瓶内棉铃虫本身涂布的物质具有明显的抑卵作用。由于涂布于饲养瓶内壁上的物质来源于：①活动过程中飞散的鳞片；②排泄物或产卵器在内壁上拖动所涂布的物质；③行走和沿壁飞行时跗节与瓶壁接触所涂布的物质。故分别测定这3种来源的物质的抑卵作用便知其确切来源。

分别用丙酮提取上述3种来源的物质生测，结果表明，腹部和跗节均具有明显的抑卵作用。前者使产卵量下降24%，中足跗节使产卵量下降也达24%。产下50%和90%卵所需时间分别推迟0.7和0.5d。

## 4 棉铃虫足上信息素腺的分布与结构

棉铃虫蛾足腹面的腿节和胫节上具有毛刷状鳞片，它们与多种雄蛾性信息素分泌腺的散发结构一样，毛刷鳞片呈圆柱形，鳞片表面纵向相间排列着肋脊，纵肋之间为成排的凹格。脊上着生有微小的棒状突起，棒状突起上靠近鳞毛的一面着生4～7个垂直的小杆，形成牙刷状结构。这些棒状突起均倾向顶端而相互叠盖，形成覆瓦状构造。毛刷鳞片的这种结构使它们具有巨大的表面积，足关合时表面可附着大量其他分泌细胞的分泌物，展开时巨大的蒸发面又使其有效地散发分泌物。

位于棉铃虫足腹面腿节上的鬃状鳞片厚壁、坚挺、中空、顶端平坦。此类腺鳞着生于具有贮液囊的腺体细胞之中。从着生部位看，棉铃虫鬃状鳞片具有支持功能，当足腿节和胫节关合时，使两者之间具有弹性，形成一定空间，以利快速展开。但从腺细胞结构看，它们也具有分泌作用。而位于胫节背面的鬃状鳞片，有的着生细胞常极度延伸而与胫节肌相接，这表明胫节肌肉参与了这簇鬃状鳞片的展开，这种展开是散发本身的分泌产物还是散发附近小型扁平鳞片的分泌产物仍需仔细地观察。

散生于棉铃虫足上的小型扁平鳞片着生细胞，具有典型的分泌细胞特征，显然具有分泌功能。

从以上几个部分的结构看，整个棉铃虫蛾的足无疑与散发香味的器官相似，也具有分

泌区域（小型扁平鳞片和鬃状鳞片着生细胞）、贮存结构（足关合时形成的夹状构造可防止信息素不必要的蒸发）和散发结构（毛刷状鳞片）。因而是一个典型的信息素分泌和散发的功能单位。

在足上还有两个重要的分泌区域，即前胫突和跗腺。前胫突上具有发达的腺体细胞和表皮细毛，是前足胫节上最为发达的分泌区域之一。跗腺管道通往前跗节的爪间垫而与外界相通。前跗分节端部具有由发达的细胞层包围的腺腔，分泌腺是两条基端与腺腔相连，顶端固着于端跗节基部内突上的管道，分泌细胞十分发达，结构类似于中肠的杯状细胞。

## 5　产卵信息素的分离与鉴定

采用定位取样提取、过滤、常温下挥发去溶剂的方法得到了产卵调控信息素的粗提品，采用 GC/MS 分析，结果如下。

将腿节粗提品挥发去丙酮后上机分析，样品的色谱图在保留时间为 4.3 和 5.0min 时具有 2 个峰值。对这两个峰值的质谱分析结果表明，它们分别为 4-甲基-3-戊烯-2-酮和 4-甲基-4-羟基-戊酮-2（表 12-4）。

同样，将跗节样品的粗提品上机分析，在色谱图上具有 3 个明显的峰值，保留时间分别为 4.0、14.7 和 16.5min。质谱分析结果表明它们分别为 4-甲基-4-羟基-戊酮-2、十六酸和（Z）-9-十八碳烯酸。

相似的表皮信息素分泌腺所含活性成分均较少，大多数分析结果仅包括 1～2 种化合物。由于本文所取样品定位很准确，避免了非靶标部位的化学成分的干扰，故分析结果主要成分仅有 2 种，与大多数定位提取的信息素的分析结果相似。可见，对分泌腺准确的定位是获得可靠的结果的前提。上述 2 种戊酮作为信息素未见报道。但与此结构相似的化合物存在于其他昆虫信息素中，如 6-甲基-5-庚烯-2-酮和 6-甲基-5-庚烯-2-醇为东方粘虫的雄蛾性信息素，4-甲基-3-庚酮为蚁科昆虫的告警信息素，异戊基乙酸和 2-庚酮为蜜蜂的告警信息素。本文的结果表明，4-甲基-3-戊烯-2-酮和 4-甲基-4-羟基-戊酮-2 或其中之一为促卵信息素。

跗节提取液分析结果表明，其也含有 4-甲基-4-羟基-戊酮-2，但无 4-甲基-3-戊烯-2-酮。腺体观察结果与分析结果的比较说明前者可能由小型扁平鳞片分泌，而后者则可能由鬃状鳞片分泌或转化，至于 2 种脂肪酸，十六酸和顺-9-十八烯酸，则由跗节腺分泌，形成脚印信息素。这 2 种酸均存在于欧洲玉米螟卵上的抑卵信息素中，不过后者以乙酸酯的形式存在，而且对欧洲玉米螟抑卵信息素的生测结果表明其不具有种的专一性。十六酸也存在于蜜蜂跗节腺、蜂后毒腺中。可见，这 2 种脂肪酸极有可能是存在于棉铃虫跗节腺中的抑卵信息素（表 12-4）。

**表 12-4　棉铃虫足表面物质粗提品气质联用分析结果**

| 样品 | 保留时间（min） | 化学组成 | 相对含量（%） |
|---|---|---|---|
| 中足腿节 | 4.29 | 4-甲基-3-戊烯-2-酮 | 15.6 |
| | 5.00 | 4-甲基-4-羟基-戊酮-2 | 84.4 |
| 中足跗节 | 4.00 | 4-甲基-4-羟基-戊酮-2 | 20.0 |
| | 14.73 | 十六酸 | 40.0 |
| | 16.49 | （Z）-9-十八碳烯酸 | 40.0 |

## 第三节　他感化合物对产卵的影响

由1种生物个体产生，影响另1种生物个体生理或行为的化学物质叫做种间信息物质，或称为他感化合物（allelochemicals）。这些物质对昆虫的他感作用已被行为、营养、生理等方面的研究及田间观察和实验所证实。一般而言，他感化合物根据引发的结果分为利己素（allomone）、利他素（kairomone）、互利素（synomone）和颉颃素。利己素仅指对释放物种有利的化学物质，利他素指的是对接受者有利的化学物质，对释放者和接受者都有利的化学物质称为互利素，相反，对释放者和接受者均不利的化学物质称为颉颃素。

他感化合物是指信息物质而言。某种生物个体产生的化学物质，仅仅在营养作用上影响另1物种，这1化学物质将不被认为是他感化合物。但是，如果这一营养成分被用于通讯，具有信息功能，它就属于它感化合物。影响昆虫产卵的他感化合物，常属于利他素和利己素。但若考虑到植物、植食性昆虫和天敌昆虫3者之间的复杂关系，则常常涉及到第三类他感化合物，即互利素。植物受到害虫为害后，常释放出一些气味性化合物，这些化合物常吸引天敌，因此对植物本身和天敌昆虫均有利。

### 1　利他素

#### 1.1　昆虫源利他素

捕食性或寄生性昆虫常利用寄主本身的气味而定位寄主，寄主的气味物质便成为了利他素。寄主气味很多是各种各样的信息素，因此Blum等（1974）认为，利他素是信息素进化过程中的负面结果。如昆虫用以标识占领资源的分散信息素，常被很多寄生性昆虫探知，作为寄主存在的信号。

寄生者 *Nemeritis canescen* 通过 *Anagasta kuehniella* 幼虫的分散信息素发现寄主，进行寄生。Prokopy等（1978）也发现，茧蜂（*Opius lectus*）感受苹实蝇分布于卵附近的产卵忌避信息素而发现寄主卵。Arthur等（1964）发现暗色怒茧蜂可被吸引到中断抱缘姬蜂标识的领地，两者又可被欧洲松梢小卷蛾幼虫的分散信息素引诱而寄生后者。

Lewis等（1971，1972）发现美洲棉铃虫鳞片的己烷提取物有刺激广赤眼蜂产卵的作用，后来经鉴定其中有效成分是一类22-25碳的直链烷烃，主要成分是二十三烷，它们存在于寄主外表，可被赤眼蜂感知。

同样地，美洲棉铃虫幼虫的虫粪中含有13-甲基三十一烷，它引起寄生蜂 *Microplitis croceipes* 在近范围内寻找寄主，而对12-甲基三十一烷不起反应。

烟青虫与美洲棉铃虫是近缘种。用人工饲料喂养时，它产生几种具有甲基支链的$C_{32}$、$C_{33}$、$C_{34}$饱和烃，大颚腺是这些饱和烃的来源，它们最终出现在唾液分泌物中，也出现在虫粪中，引起茧寄生蜂 *Cariochiles nigreceps* 寻找寄主。

小茧蜂 *Anthonomus grandis* 被寄主马铃薯块茎蛾的粪便所引诱，并且用产卵器探查粪便。虫粪中的引诱性化合物是庚酸，它是马铃薯块茎蛾幼虫从马铃薯中摄取的，并在消化道中被浓缩。

与此类似，寄生者也可被昆虫的聚集信息素所吸引。棘胫小蠹利用聚集信息素吸引同类聚集为害松树，以克服松树的抵抗。而棘胫小蠹的寄生性和捕食性天敌也利用棘胫小蠹的聚集信息素在棘胫小蠹为害的松树上形成群体。可见，棘胫小蠹的聚集信息素不仅可协调小蠹本身的聚集、交配、取食和产卵，而且也协调了天敌的交配、成虫和幼虫取食等活动。

研究表明，松小蠹的寄生者或捕食者中，至少有 6 种可以被松小蠹的聚集信息素所引诱，接近松小蠹产卵或捕食。在此处，聚集信息素无疑成为了利他素。

有一些寄生性天敌利用害虫的性信息素而寻找害虫。如黑卵蜂 *Telenomus remus* 被草地贪夜蛾的腹末端化合物（包含性信息素）所吸引，而寻找后者的卵寄生。红圆蚧的性信息素，对印巴黄蚜小蜂具有显著的引诱作用。雄性的稻绿蝽，分泌性信息素吸引雌性的同时，也吸引来了寄生蝇 *Trichopoda pennipes*（表 12-5）。

**表 12-5 被寄生性昆虫利用的昆虫信息素**

| 信息素类型 | 寄主 | 寄生者 |
|---|---|---|
| 性信息素 | 红圆蚧 *Aonidiella aurantii* | 印巴黄蚜小蜂 *Aphytis melinus* |
| | 稻绿蝽 *Nezara viridula* | 寄蝇 *Trichopoda pennipes* |
| | 黑卵蜂 *Telenomus remus* | 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* |
| 聚集信息素 | 小蠹（*Ips paraconfusus*） | 金小蜂（*Tomicobia tibialis*） |
| | 欧洲榆小蠹（*Scolytus multistriatus*） | 金小蜂（*Cheropacus quadrum*） |
| 分散信息素 | 暗色怒茧蜂（*Orgilus obscurator*） | 中断抱缘姬蜂（*Temelucha interruptor*） |
| | *Anagasta kuehniella* | *Nemeritis canescens* |
| | 苹实蝇（*Rhagoletis pomonella*） | 茧蜂（*Opius lectus*） |
| | 美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* | 广赤眼蜂（*Trichogramma evanescens*） |
| | | 寄生蜂（*Microplitis croceipes*） |
| | 马铃薯块茎蛾（*Gnorimoschema operculella*） | 小茧蜂（*Anthonomus grandis*） |

此外，有些营养物质也具有信息功能。丁德成等（1981）报道，刺激螟卵齿小蜂搜索和产卵的利他素存在于寄主卵块的卵毛和雌虫的尾毛中，能被丙酮和水（1∶1）的混合液提取，但不能被正己烷所抽提。进一步的研究证明，这种有效成分是丝氨酸和甘氨酸。Bin 等（1993）发现紧贴着稻绿蝽卵的 1 层多聚粘多糖蛋白能够激发其天敌沟卵蜂的产卵刺探行为。

如果把利他素放在非寄主的昆虫身上，寄生蜂可以攻击该昆虫，但不在其中产卵。可见，寄生蜂产卵器也可鉴定寄主体内利他素，从而决定是否产卵。

Rajendram 等（1974，1978）首先测定了加州赤眼蜂对假卵内含物某些成分的产卵反应，发现雌蜂不在蒸馏水中产卵，却能在 Grace 昆虫组织培养液和生理盐水中产卵。进一步研究表明，当生理盐水中加入 RNA 和水解酪蛋白后，产卵效果有所提高。

Arthur 等分离了寄主血淋巴的各种成分，证实了促使埃姬蜂产卵的物质为血淋巴中的氨基酸成分，并人工配制了由丝氨酸、精氨酸、亮氨酸和氯化镁组成的溶液，引诱产卵的效果优于血淋巴。

根据以上研究结果，巫之馨等对松毛虫赤眼蜂的产卵刺激物做了大量的研究，证实了

在20种合成蛋白质的L氨基酸中，只有亮氨酸、苯丙氨酸和异亮氨酸具有促卵效果，最适浓度分别为2mg/ml、4mg/ml和3.2mg/ml。将3种氨基酸混合，促卵效果更好，最佳混合比为6mg/ml:4mg/ml:4.25mg/ml。赤眼蜂在这种混合液中的产卵量多于在寄主血淋巴中的产卵量。各种盐类、糖类、有机酸及维生素都没有促卵作用。

在甲腹茧蜂上的研究也得到了类似的结果：精氨酸、组氨酸和赖氨酸等几种碱性氨基酸能激发该茧蜂的产卵行为。

### 1.2 植物源利他素

植物挥发性化合物可影响鳞翅目成虫对产卵寄主的定向。研究表明，韭葱蛾对韭葱的挥发性物质具有明显的正趋向性。这主要是挥发性物质中含硫化合物引起的，其中以Propylthiosulfinate引诱活性最强（Thibout et al，1982）。

粉纹夜蛾对感虫大豆的挥发物有明显的正趋向性。这是因为其中含有较高浓度的4-已烯-1-醇，2，2-二甲基己醛和2-已醛（Liu et al，1988）。同样，*Amyelois transitella* 可被杏仁油的香味所引诱（Phelan et al，1987）。

花的香味成分，如苯乙醛，引起了粉纹夜蛾逆风飞向 *Abelia grandiflora* 的花（Haynes et al，1991）。苯乙醛、苯甲醛和乙酸苄酯是夜晚开花的素馨属植物引诱粉纹夜蛾逆风飞行的主要化学成分（Heath et al，1992）。

而一旦蝶蛾成虫降落后，植物表面的化学信息对其决定产卵具有十分重要的作用。如牛眼蝶是专食性昆虫，取食含有iridoid糖苷的植物。珊瑚木苷（aucubin）和梓苷（catalpol）是存在于 *Plantago lanceolata* 的主要糖苷，它是引诱牛眼蝶产卵的主要活性成分（Pereyra et al，1988）。

近来，在美国和澳大利亚研究普累克西斑蝶的结果表明，雌蝶喜好在含有中等浓度的强心苷的马利筋上产卵（Oyeyele et al，1990；van Hook et al，1991；Zalucki et al，1990）。

美国对菜粉蝶和欧洲对大菜粉蝶的研究结果表明，黑芥子硫苷酸钾虽有一定的产卵引诱作用，但芸薹葡糖硫苷（glucobrassicin）的引诱作用更显著（Renwick et al，1992；van Loon et al，1992），而glucoiberin（R-3-甲基亚硫酰丙基芸薹葡糖硫苷）则无效。Sachdev等（1992）测定结果表明，小菜粉蝶对芳香族糖苷反应显著，但对侧链上具有硫原子的糖苷无反应。

从胡萝卜叶中分离出的2种彼此协同的化合物绿原酸和毛地黄黄酮-7-O-（6'-O-丙二酰基）-β-糖苷，对乌凤蝶的引诱效果可达叶片引诱效果的70%（Feeny et al，1988）。几年的鉴定工作终于确定了引诱金凤蝶产卵的化学物质是来源于寄主植物的4种类黄酮糖苷和6种强极性的物质，它们表现出强烈的协同活性。对另1种凤蝶而言，来源于寄主植物的橙皮苷（hesperidin）、（ ）-脱氧肾上腺素（synephrine）和水苏碱（stachydrine）是引诱的主要成分。绿原酸对这种凤蝶的产卵也有明显的引诱效果（Honda，1990）。另一种凤蝶可被彼此协同的混合成分马兜铃酸、2种肌醇和1种甘油糖苷所引诱（Papaj et al，1992；Sachdev-Gupta et al，1993）。

类似地，黑芥子硫苷酸钾（sinigrin）是小菜蛾怀卵雌蛾寻找产卵寄主的特征性引诱物质（Renwick，1990）。在这种物质的引诱下，小菜蛾容易找到喜爱的十字花科蔬菜产

卵。

对实夜蛾属昆虫的测定结果表明，烟芽夜蛾对烟草叶片中的两个三萜类异构体表现出明显的趋性（Jackson et al，1986）；美洲棉铃虫的产卵被 3 个结构相关的倍半萜烯羧酸刺激（Coates et al，1988）。

## 2 利己素

### 2.1 植物源利己素

粉纹夜蛾对抗虫大豆的挥发物表现出明显的忌避作用。这是因为抗虫性大豆中含有较高浓度的十四烯和十二烯（Liu et al，1988）。它们是粉纹夜蛾的产卵忌避剂。

*Etiella zinckenella* 的产卵作用可被丁香酚（eugenol）明显抑制（Hattori et al，1992）。小菜粉蝶的产卵活动可被 2 种强心苷 erysimoside 和 erychroside 所抑制。这 2 种化合物均以毒毛旋花子苷作为糖苷配基，但与糖的联接部位不同。以毒毛旋花子苷作为糖苷配基的另 1 种强心苷——磁麻苷（cymarin），也抑制小菜粉蝶的产卵活动，但其他强心苷如毛地黄毒苷（digitoxin）、G 毒毛旋花苷（ouabain）和 helveticoside 等便无抑制活性（Re-nwick et al，1989；Sachdev-Gupta，1990）。研究表明，来自另 1 种植物的 2 种葫芦素类糖苷对小菜粉蝶产卵也有明显的抑制作用（Huang et al，1993）。

洋葱种蝇（*Delia antiqua*）的产卵可被松针油所抑制。Ntiamoah 等（1996）对松针油进行了分离、鉴定和生测。结果表明，存在于松针油中的 3 种单萜类化合物，即 3-carene、柠檬烯（limonene）和对伞花烯（*p*-cymene）是主要活性物质。

白菜种蝇（*Delia redicum*）的产卵也可被 3-carene、柠檬烯和对伞花烯混合物显著抑制。若加入另外 3 种单萜类化合物，terpinolene、γ-水芹烯（γ-phellandrene）和香叶烯（myrcene），抑制效果更为明显（Yaw et al，1996）。此外，白菜种蝇的产卵也能被松节油所抑制。

### 2.2 昆虫源利己素

很多昆虫为了防止其他种昆虫对自己已经拥有的资源的侵占，常分泌一些挥发性化合物划定自己的地域。这些挥发性化合物对同种其他个体或不同种个体具有忌避作用。作用于同种时为信息素，在前面已详细介绍，作用于不同种时则为利己素。

白菜种蝇的产卵可被 3，5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸所抑制，这是一种存在于为害白菜的鳞翅目幼虫粪便中的化合物。也许，鳞翅目幼虫通过这些气味确定自己的存在，排斥其他害虫对其拥有资源的侵占，从而达到保护自己食物的目的。

## 3 互利素

植物的气味除了引诱害虫之外，很多对害虫的天敌也有引诱作用。此时这些气味物质便具有互利功能，即对植物本身和害虫天敌均有益。

大部分十字花科植物含有异硫氰酸烯丙酯，甘蓝蚜的天敌菜少脉蚜茧蜂利用这一化合物气味先定位植物，再搜寻食植者，达到寄生的目的。落叶松以及落叶松叶蜂对卵寄生蜂

都有吸引作用，叶蜂寄生率在纯落叶松中可达 86%，但当落叶松与其他树种种植在一起时，寄生率减少到仅 20%左右，表明落叶松气味对寄生蜂的吸引作用非常之大。

玉米中含有二十三烷，美洲棉铃虫将这种物质不加改变的结合到鳞片中，这些鳞片在产卵时又覆盖于卵上，从而成为广赤眼蜂的产卵标识物。

寄主植物的它感物质通过植食者的取食活动或排泄的粪便释放，这些挥发性物质被天敌用作寄主定位标记。Roth 等（1978）报道，蔗螟在甘蔗上取食后排泄的粪便刺激其天敌厉寄蝇（*Lydella diatraeae*）的产卵，而在高粱上取食的蔗螟排泄的粪便不刺激产卵。

有些植物，当受到植食性昆虫取食时，散放互利素吸引天敌，这是一种“SOS”信号。如某些十字花科植物常是无气味的，但受到害虫攻击时，便释放 1 种酶激发防御性芥子油转换成吸引寄生蜂的衍生物。松树受松小蠹攻击时产生的大量 α-蒎烯引诱松小蠹的寄生蜂 *Heydenia unica*，α-蒎烯高度有效的把寄生蜂引诱到最有可能找到南部松小蠹的地方。

植物抗生性物质引起植食性昆虫生理和行为发生变化，发育速率或活动性降低，使得天敌容易寄生。在这种情况下，这些抗生性物质也变成了互利素。

## 第四节　其他来源的产卵调控物质

在长期进化过程中，很多种类的昆虫形成了可以利用环境中存在的某些特征性化学物质，鉴定环境适宜程度的本领。这些表征环境适宜程度的化合物可以刺激或引诱也可以忌避或阻止昆虫的产卵，从而指示昆虫寻找到适宜环境，无疑对昆虫种群的繁衍具有非常重要的作用。

### 1　对蚊类产卵的影响

怀卵伊蚊（*A. triseriatus*）被腐烂桦木浸出液引诱，而新鲜桦木浸出液无效。有效成分对甲苯酚具有与浸出液同样的引诱效果。室内测定结果表明，对甲苯酚比蒸馏水对伊蚊（*A. triseriatus*）的引诱作用强得多。统计被引诱伊蚊时发现，被引诱的雌蚊和雄蚊数目几乎相等，因而对甲苯酚的引诱作用没有性别差异。对埃及伊蚊的生物测定也得到了相同的结果：对甲苯酚可强烈引诱雌蚊和雄蚊。

对甲苯酚的合成类似物对伊蚊（*A. triseriatus*）的产卵也具有显著的刺激作用。其中一些类似物是嗅觉刺激剂，而另一些则是触觉刺激剂。Bentley 等（1982）的电生理学研究表明，类似物 4-甲基环己醇及其异构体被伊蚊（*A. triseriatus*）触角上粗短的、点状的 A2 感觉器接受，而对甲苯酚被粗短的、具钩状顶端的感觉器所接受。在室外的广泛调查中，昆虫学家们发现，这些酚类物质广泛存在于具水的树洞中，而这些树洞，正是伊蚊属昆虫的产卵场所。显然，伊蚊属的雌蚊被这些化合物引诱，前来产卵。但雄蚊也被同时引诱的原因不甚明确，也许是前来寻找异性配偶。

室内测定了 150 种化合物对库蚊（*C. pipiens fagigans*）的促卵作用，结果只有 2 种化合物：山毛榉木溜油和 N-丁基-N-乙基-O-藜芦胺（veratrylamine），对怀卵库蚊表现出明显的促卵作用。用库蚊（*C. pipiens fagigans*）的进一步研究表明，青草浸出液、饱和

甲烷水溶液、糖醛和干草浸出液均可显著刺激产卵。

Ikeshoji 等（1974）测定了具有羰基和其他几类基团的化合物 124 种。在这些化合物中，仅有 8 种对库蚊（*C. pipiens fagigans*）有效。这些有效物质大都是具有 α-乙基的含 9 个碳原子的化合物。这些，也许是库蚊在野外寻找适宜水环境产卵时的指标。

与促进产卵相反，环境中的有些化合物对蚊类产卵具有显著的抑制作用，如乙酸、丙酸、异丁酸、异戊酸和癸酸显著抑制库蚊（*C. tarsalis*）和 *C. quinquefasciatus* 的产卵。而这些产物，都是青草浸水后经厌氧微生物发酵腐烂变酸后所具有的化学成分。其中有些如异丁酸等，对低龄的幼虫有毒。显然，这些化合物是野外具水地点不利于幼虫生长的指标，成蚊避免在其中产卵，对后代繁衍具有非常重要的意义。

对 5 碳到 13 碳的有机酸的进一步的研究表明，壬酸是埃及伊蚊、库蚊（*C. tarsalis*）和 *C. quinquefasciatus* 产卵的有效抑制剂，野外试验进一步证明了壬酸的抑卵活性。对 14 碳到 24 碳的不饱和酸的抑卵活性也进行了研究，Z 型结构的酸抑卵活性较强。在所有测定了的有机酸中，以（Z）-9-十八碳烯酸对库蚊（*C. quinquefasciatus*）的活性最强。

此外，有些化合物虽对蚊虫产卵具有明显的促进或抑制作用，但其生态学意义仍需进一步研究。

Perry 等（1967）报道，怀卵埃及伊蚊在室内对脂肪酸酯表现出引诱反应，埃及伊蚊由嗅觉器官确定脂肪酸酯的位置。由于去除触角的怀卵雌蚊不能准确定向这些化合物，表明这些化感器存在于触角上。Davis（1976）随后的试验表明，触角上粗短的、具钩状顶端的感觉毛是甲基丁酸酯的受体。低分子量的脂肪酸酯如乙酸酯、丙酸酯和丁酸酯的引诱作用最强，可能与这些酯类的挥发性较强有关。这些脂肪酸酯不存在于野外埃及伊蚊的产卵场所，因此这种现象的生态学意义令人费解。

一些萜类化合物，如甲基异丙基苯酚（carvacrol）、柠檬醛（citral）、丁香酚（eugenol）和法尼醇（farnesol），在室内测定中对埃及伊蚊的产卵均有引诱作用。它们同时也抑制埃及伊蚊卵的孵化。而另一些如桉树醇（eucalyptol）、香茅醛（citronillal）和香叶醇（geraniol），可显著抑制埃及伊蚊的产卵。这些化合物在自然界均来源于植物，它们与埃及伊蚊在野外的产卵习性的关系仍需研究。

癸酸是 1 种杀幼虫剂，开始对怀卵库蚊（*C. restuans*）的产卵具有抑制作用，但不久又促进产卵。进一步的研究表明，促卵作用是由于细菌分解癸酸造成的，在室内，含有癸酸分解产物的水还可促进埃及伊蚊和其他库蚊产卵。随后的研究表明，癸酸液中培养细菌 *Pseudomonas aeruginosa* 后，其残液引诱埃及伊蚊产卵。成分分析表明，这是细菌代谢产物 7，11-二甲基十八烷。

昆虫生长调节剂烯虫酯（methoprene）在野外和室内均显著刺激埃及伊蚊产卵。在田间试验中，处理比对照的卵量增加 1 倍以上。

## 2　对其他昆虫的影响

腐烂的桃树在真菌作用下，产生特有的腐木味，这种味道对实蝇幼虫的寄生蜂具有强烈的引诱作用。成分分析表明，这是一类小分子挥发性化合物，主要由乙醇、乙醛组成。

# 第十三章 昆虫的蜕皮激素

1954年Karlson首先报道了1种与昆虫蜕皮和变态有关的激素——蜕皮酮（ecdysone），或者称为蜕皮激素（molting hormone），说明昆虫的蜕皮同时受JH与蜕皮激素的调控。昆虫血淋巴中这两种激素的浓度变化，引发从幼虫到幼虫的蜕皮以及变态的发生。但后来的研究发现，蜕皮激素除了调控昆虫的蜕皮以外，还具有调节生长和生殖的功能。近年来在激素的分离、生物合成和代谢以及受体的结构与作用机制等方面都有了很大的进展。

Karlson报道蜕皮酮时，他认为含4个环的甾类并带有胆甾醇侧链的即为典型的甾类激素。1960年以后，从植物中分离到许多具蜕皮激素活性的甾类。同时也使蜕皮激素这一名称发生了混乱，而前胸腺分泌的蜕皮激素，并非都是蜕皮酮，部分是3-脱氢蜕皮酮。3-脱氢蜕皮酮在血淋巴中才转化为蜕皮酮。蜕皮酮在脂肪体内，以20位碳的羟基化，转化为活性更强的20-羟基蜕皮酮。因此，在血淋巴中大多是蜕皮酮与20-羟基蜕皮酮同时存在，两者比例从昆虫胚后发育开始，不断的发生变化，由最初单一的蜕皮酮最终成为2种蜕皮甾醇的混合物。

蜕皮甾醇的名称是1978年由Goodwin提出的，这是蜕皮酮及其类似物的总称。在节肢动物、棘皮动物、软体动物和环节动物中发现的称为动物蜕皮甾醇（zooecdysteriods），Rees（1989）统计80种动物中已发现有动物蜕皮甾醇61种。在植物界检测，150种植物有植物蜕皮甾醇（phytoecdysteriods）。Lafont与Wilson（1992）报道了196种来自动植物的天然蜕皮甾醇（包括代谢产物）。这么多的化合物都称为蜕皮甾醇，令人眼花缭乱。为此Lafont与Horn提出称为蜕皮甾醇，必须具备：①有A环与B环结合的甾醇骨架；②有7-烯、6-酮的结构；③14碳位有羟基

(α-)，例如14α-羟基7-烯，4-烯或14-烯甾醇相关化合物。根据这一定义，动物蜕皮甾醇中6种，植物中蜕皮甾醇中42种都属蜕皮甾醇范畴。综上所述Goodwin的概念是广义的，而Lafont与Horn的概念是狭义的。

上述定义是从化学角度出发的。从生物学角度来看，蜕皮甾醇是指有蜕皮活性的激素，实际上在蜕皮甾醇类似物中一部分并没有蜕皮活性。此外，蜕皮甾醇与蜕皮激素作为同义语，两者并没有明确区别。

后来发现，具蜕皮活性的是20-羟基蜕皮酮而不是蜕皮酮，前者也是节肢动物蜕皮所必需的，然而既使在昆虫体内，不同种类所含的蜕皮激素种类也不完全相同。例如在异翅目中（如乳草蝽）有高浓度的24-甲基20-羟基蜕皮酮（马克蜕皮酮A，makisterone A)，它在膜翅目（如蜜蜂）和双翅目昆虫体内，并且成为主要蜕皮甾醇。在昆虫卵或胚胎内，2-脱氧蜕皮酮和26-羟基蜕皮酮都具有激素功能。

植物甾醇具有保护植物不受植食性昆虫为害的作用（因为有时蜕皮甾醇被摄入昆虫体内，可能成为有害物质)。根据昆虫的自卫本能，这些物质往往成为有效的抑食剂而使昆虫停止取食（Lafont，1990)，而多食性昆虫具有分解消化道中甾类物质的脱毒机制，因此能有效地保护自己，甚至在高剂量的情况下，能取食含蜕皮甾醇的植物而安然无恙。当用蜕皮酮或20-羟基蜕皮酮喂饲二点蟋蟀（*G.bimacnlatus*）时，它能有效地将这些物质转化为14-脱氧蜕皮甾醇。因为消化道中细菌能使蜕皮酮或20-羟基蜕皮酮脱去14-羟基(图13-1，图13-2)。

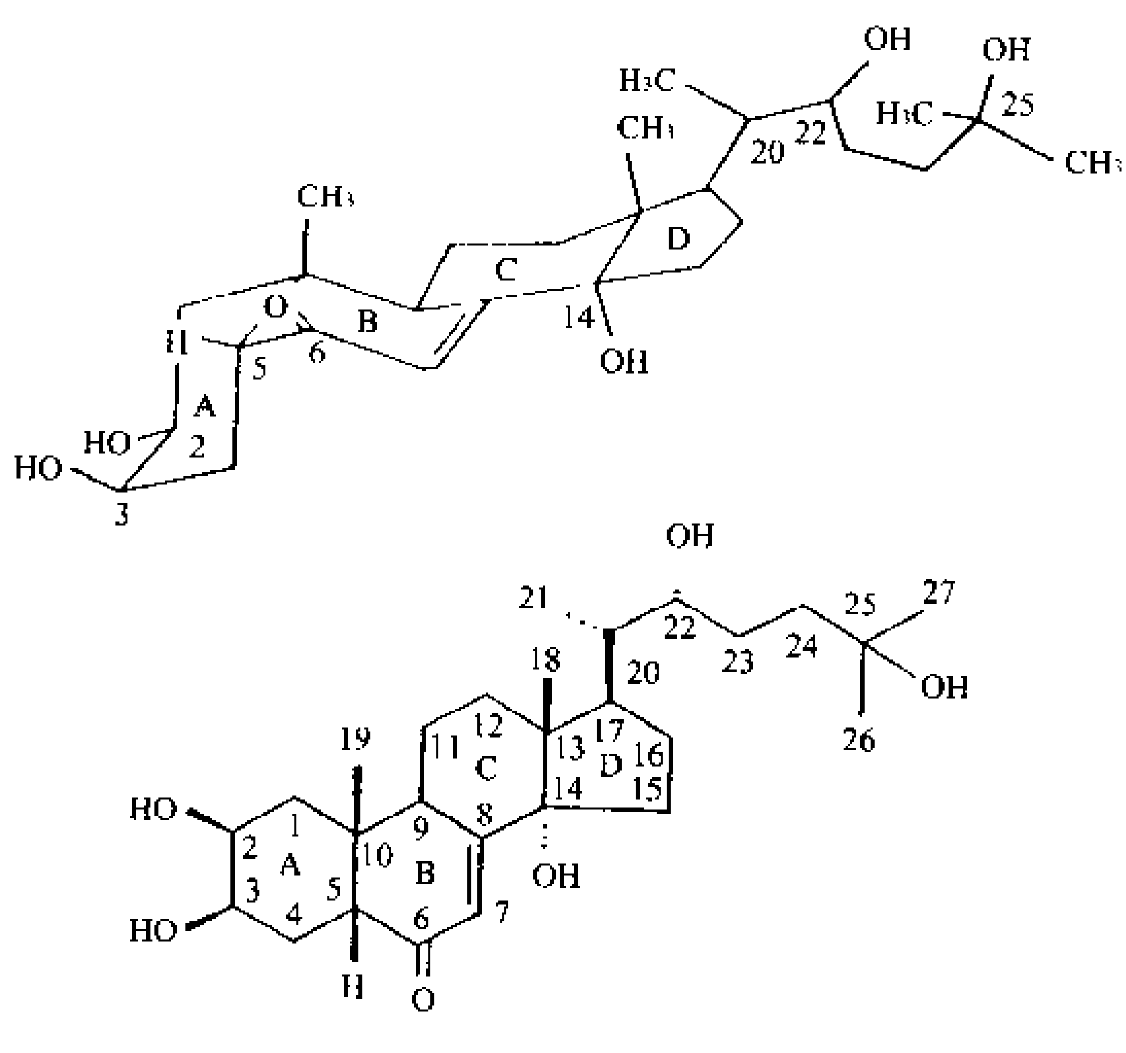


图13-1 蜕皮酮的结构

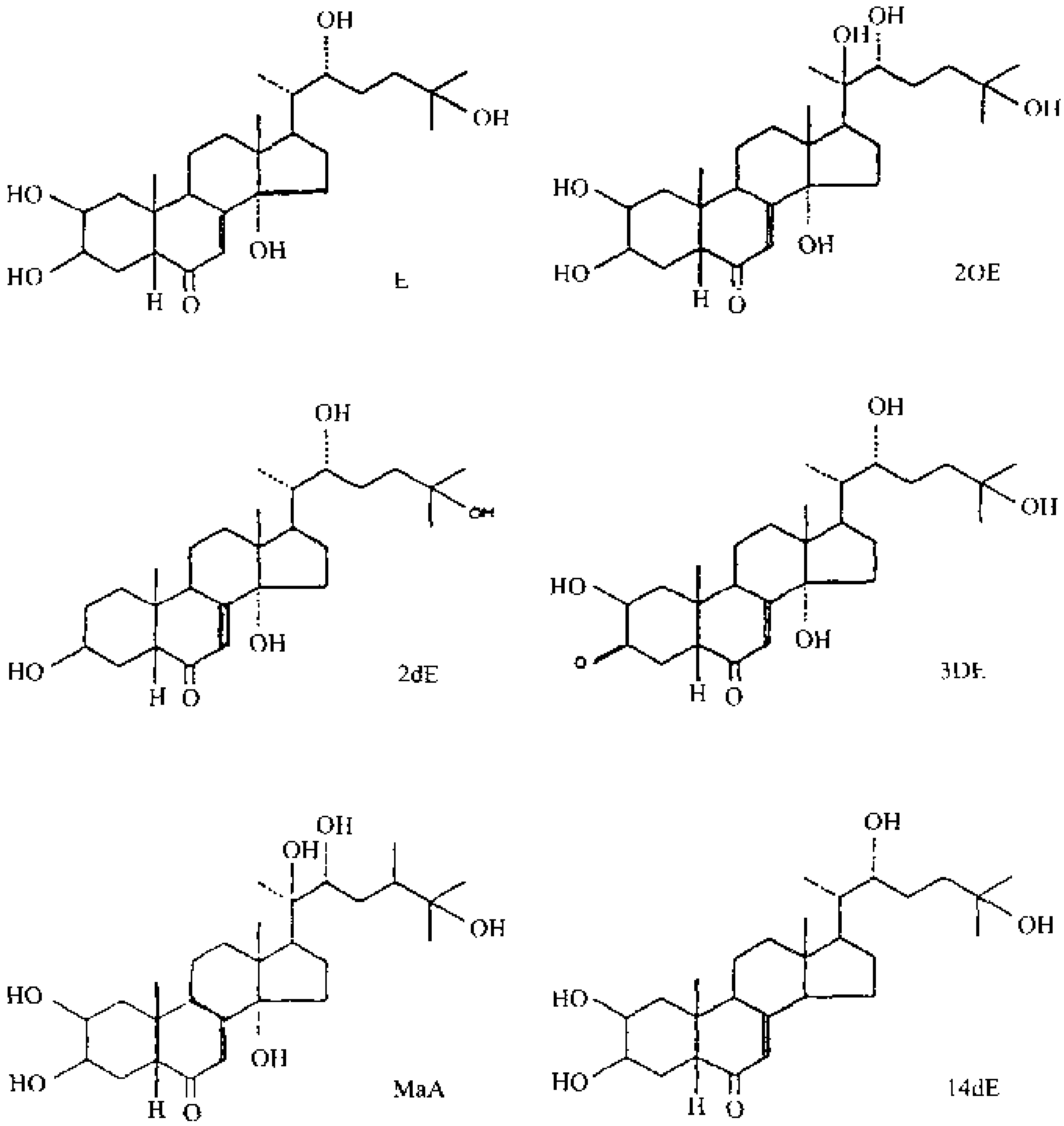



图 13-2　6 种蜕皮甾醇的结构

E. 蜕皮酮　20E. 20-羟基蜕皮酮　2dE. 2-脱羟基蜕皮酮
3DE. 3-脱氢蜕皮酮　MaA. 24 甲基-20-羟基蜕皮酮
14dE. 14-脱羟基蜕皮酮

## 第一节　蜕皮甾醇的生物合成

许多研究工作者花了 20 年时间，才证明蜕皮甾醇在昆虫体内激发蜕皮的生理作用。Fukuda 首先发现它们是由成对的前胸腺分泌的，但不久人们又发现昆虫的卵巢也能合成蜕皮甾醇。1965 年搞清了蜕皮激素的结构，到 1966 年植物中发现了大量蜕皮甾醇，从而为化学方面的研究提供了较多的材料。一系列超微量分析技术的应用，加快了研究进度。1972 年以后放射免疫技术已经可以检测到微量的蜕皮甾醇。通过离体培养实验，证明家蚕前胸腺能够产生蜕皮甾醇。培养开始和以后几小时进行含量测定，结果表明产物内有 3 种类似物，从此开始了生物合成的系统研究。

## 1 合成部位

在昆虫的幼虫体内，前胸腺或它们的同类腺体（双翅目中的环腺，一些原始昆虫体内的腹腺），是合成蜕皮酮的组织。当昆虫受到某些信号刺激之后，从脑中释出促前胸腺合成蜕皮甾醇的激素（PTTH），并由前胸腺分泌蜕皮酮进入血淋巴。前胸腺释出的蜕皮酮在细胞外与蛋白质结合。激素并不在腺体内贮存，而是被转化为20-羟基蜕皮酮。在脂肪体、马氏管和中肠内都存在使蜕皮酮转化的单氧化酶。

在昆虫的前胸腺中，蜕皮甾醇的生物合成途径大部分已得到证实（表13-1）。

表 13-1 昆虫体内的蜕皮甾醇的合成部位

| 种 类 | 器官 | 蜕皮甾醇 |
|---|---|---|
| 黄粉甲（*Tenebrio molitor*） | 前胸腺 | 0.005%～0.0038%E（48h） |
| 飞蝗（*Locusta migratoria*） | 前胸腺 | 1%～20%E |
| | 卵巢 | 0.012%K（2h），0.2%20E（20h） |
| 家蚕（*Bombyx mori*） | 前胸腺 | 0.0082%E（5d） |
| 烟草天蛾（*Manduca sexta*） | 前胸腺 | 0.2%～2%E+3DE |
| 二点蟋蟀（*Gryllus bimaculatus*） | 卵巢 | 0.0014%E |

注：K.酮二醇 E.蜕皮酮 3DE.3-脱氧蜕皮酮 20E.20-羟基蜕皮酮（仿Lafont等，1995）

从胆甾醇或酮二醇开始合成蜕皮酮，除了典型的来源前胸腺和卵巢以外，皮细胞腺和绛色细胞等都能产生蜕皮酮。

## 2 合成途径

胆甾醇转化为蜕皮甾醇具有多个步骤，中间的若干步骤已经探索了20多年，但至今仍是一个“暗箱”，虽然不少人对此提了种种假设，可惜都缺乏说服力（图13-3，13-4）。

Lafont等（1995）采用对比的方法寻找蜕皮甾醇相关的分子，发现昆虫和动物中蜕皮甾醇的合成途径相一致，而与一些海洋无脊椎动物和植物中蜕皮甾醇的合成途径无联系。提出的假设中不同之处在于：首先14α-羟化作用是一个独立反应，理由是：①在飞蝗卵巢中同时存在二酮醇和酮二醇；②在 *Laurecia pinnata* 中同时存在百日青甾醇（pinnasterol）和14α-羟基百白青甾醇（14α-hydroxypinnasterol）；③最近研究发现，在植物系统中酮醇14α-羟基化生成酮二醇（表13-2）。第二个不同之处是5β-还原酶对3-酮-$\triangle^4$底物的作用类似于脊椎动物中细胞溶质酶对胆汁酸生物合成或类甾醇类激素的分解代谢。这些假设的验证需要合适的标记底物。

表 13-2 昆虫体内检测到胆甾醇或酮二醇转化为蜕皮酮的组织

| 昆 虫 | 虫 态 | 器 官 | 方 法 | 来 源 |
|---|---|---|---|---|
| 飞蝗 | 幼虫 | 体壁 | RIA | Cassier 等，1980 |
| | 幼虫 | 皮细胞 | RIA | Procheron 等，1980 |
| | | | | Procheron 等，1984 |

（续）

| 昆虫 | 虫态 | 器官 | 方法 | 来源 |
|---|---|---|---|---|
| 二点蟋蟀 | 雌成虫 | 皮细胞 | RIA | Hoffmar 等，1992 |
| 德国蜚蠊 | 细胞（胚胎） | 皮细胞 | RIA | Ward 等，1987 |
| 黄粉甲 | 幼虫 | 绛色细胞 | C | Romer 等，1974 |
| 黄粉甲 | 蛹 | 皮细胞 | RIA，K | Delbecque 等，1986 |
| 墨西哥棉铃象甲 | 细胞（胚胎） | 皮细胞 | RIA | Stiles 等，1992 |
| 家蚕 | 幼虫 | 绛色细胞 | BIO，RIA | Ruhland 等，1977 |
| 家蚕 | 幼虫 | 皮细胞 | RIA，C，K | Romer，1957 |
| 烟草天蛾 | 幼虫 | 绛色细胞 | RIA | Ma 等，1985 |
| 烟草天蛾 | 细胞（胚胎） | 皮细胞 | RIA | Marks 等，1985 |
| 粉纹夜蛾 | 细胞（幼虫） | 皮细胞 | RIA | Lynn 等，1987 |
| 大蜡螟 | 蛹 | 中肠 | RIA | Sehnal 等，1990 |
| 伸展摇蚊 | 细胞（胚胎） | 皮细胞 | RIA | Spindler 等，1991 |

注：RIA. 放射免疫测定 BIO. 生物测定 C. 从胆甾醇合成 K. 从酮二醇合成

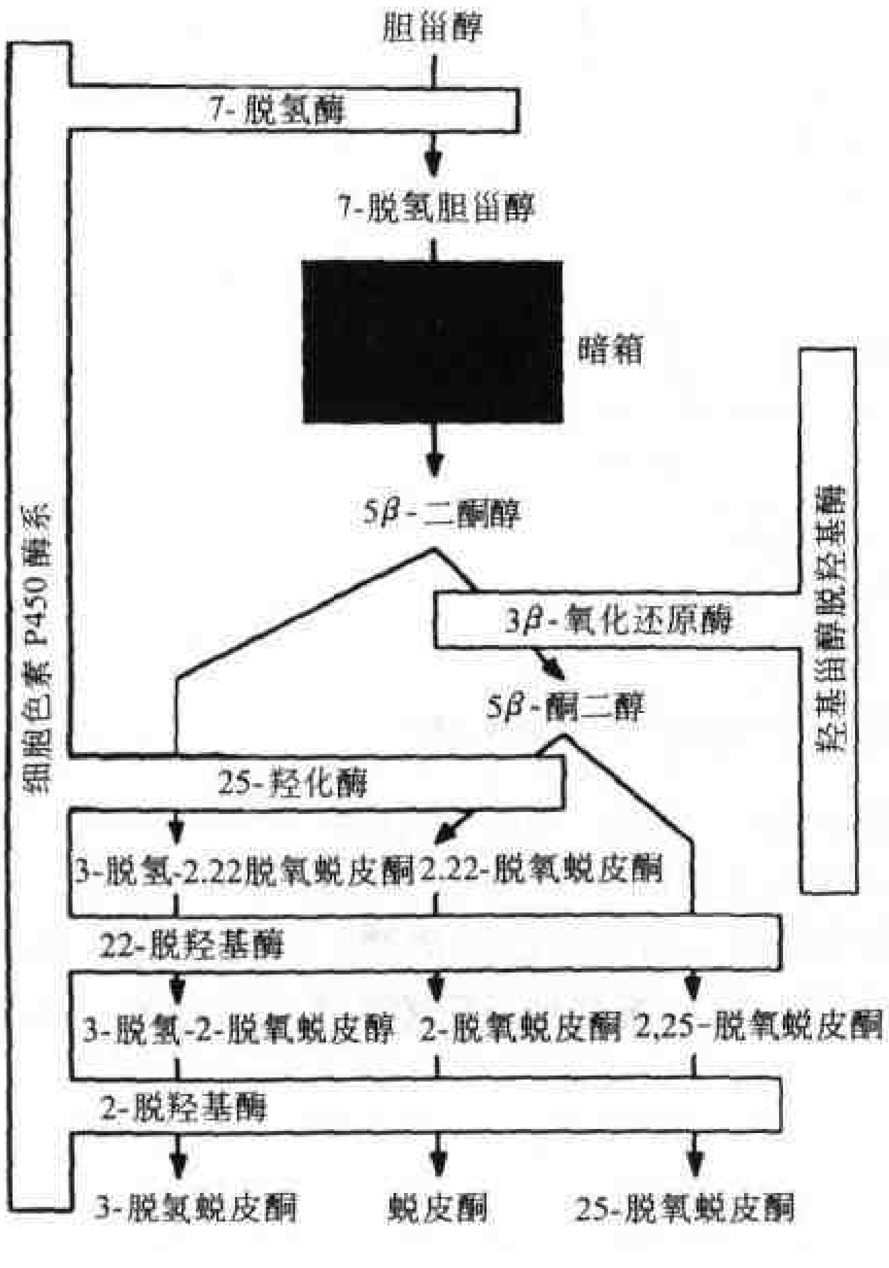



图 13-3 蜕皮甾醇生物合成的主要步骤
（仿 Lafont 等，1995）

蜕皮甾醇生物合成前几步的假设包括各类蜕皮甾醇分子中，7-脱氢胆甾醇的氧化作用可能形成环氧化物或 5α，8α-表二氧甾醇，后者的类似物通常存在于海洋无脊椎动物中。

令人迷惑的是前胸腺分泌物的多样性，除蜕皮酮以外，鳞翅目昆虫中既能分泌蜕皮酮，还能分泌 3-脱氢蜕皮酮，其他甲壳纲动物的蜕皮腺能分泌 25-脱氧蜕皮酮。腺器官既能产生蜕皮酮和 3-脱氢蜕皮酮，又能产生蜕皮酮和 25-脱氢蜕皮酮。其原因在于两种主要酶，即 3β-氧化还原酶和 25-羟化酶，它们的控制速率不同，另外酶的底物特异性也有差异，许多终端羟化酶都是如此。

## 3 昆虫前胸腺中蜕皮酮的合成

前面已经叙述了蜕皮酮的主要合成步骤，但在前胸腺中它是如何合成的？这是人们一直在探索的问题。蜕皮激素的存在及其功能早在 1939 年起已有报道，但经历了半个世纪以后，直到

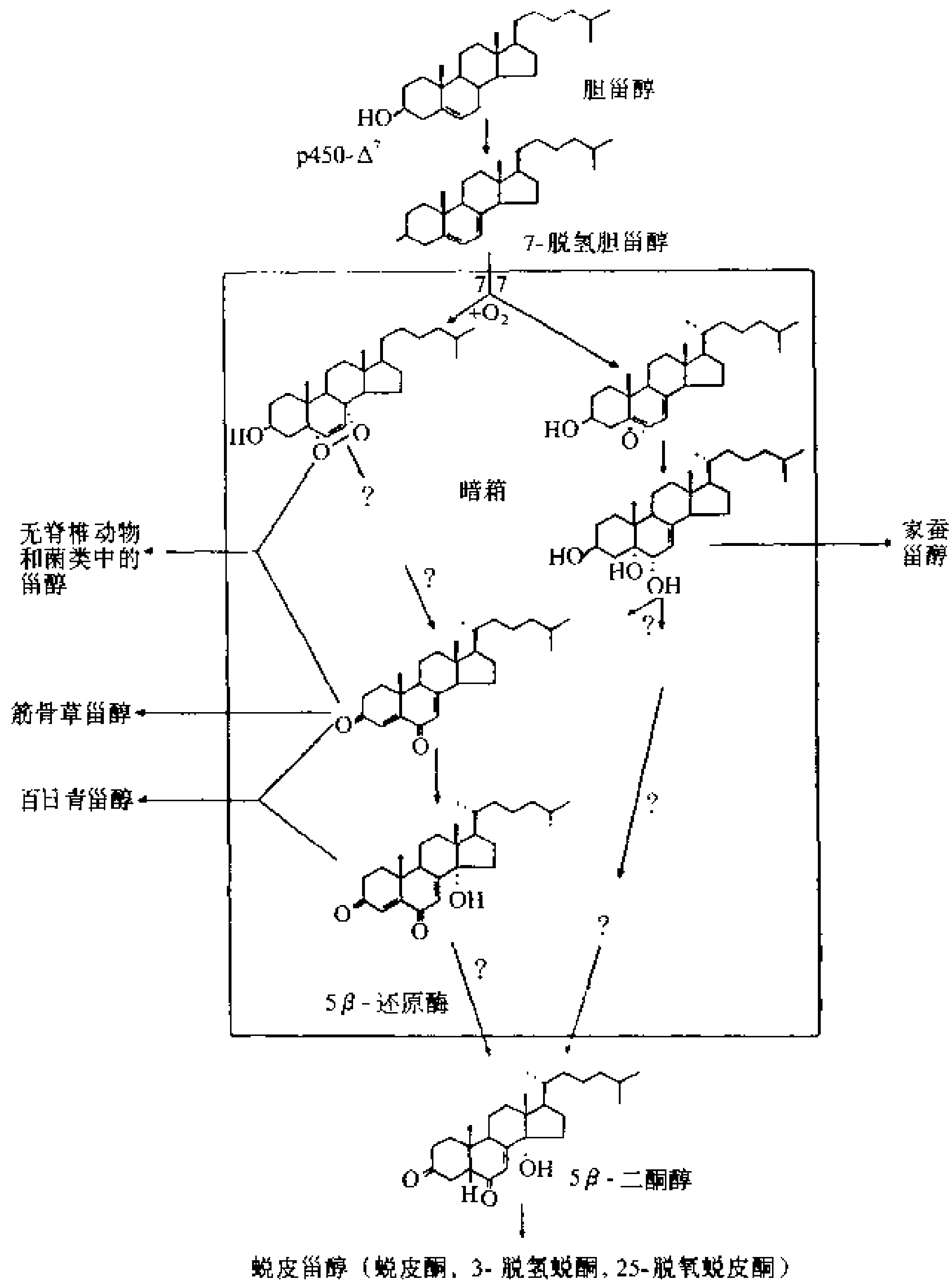



图 13-4　推测蜕皮甾醇合成途径中“暗箱”内的几个步骤

（仿 Lafont 等，1995）

1965 年才确定蜕皮酮的结构。当时生物合成路线一时间无法搞清楚。因为以前并不知道调节蜕皮酮合成的酶类，只是知道两种中间体。有关酶类到以后才陆续有所报道，在此基础上形成了间接的或推断的合成路线。

### 3.1　从植物甾醇到胆甾醇

蜕皮甾醇最初是以胆甾醇为基质进行合成的。因为昆虫体内并无从乙酸低分子合成胆甾醇的酶类，因此，不能从头合成胆甾醇。它的胆甾醇来自植物中甾醇类（图 13-5）。肉食性昆虫则从动物性食物中获得胆甾醇。植物甾醇类中胆甾醇侧链的 24 位碳原子甲基化

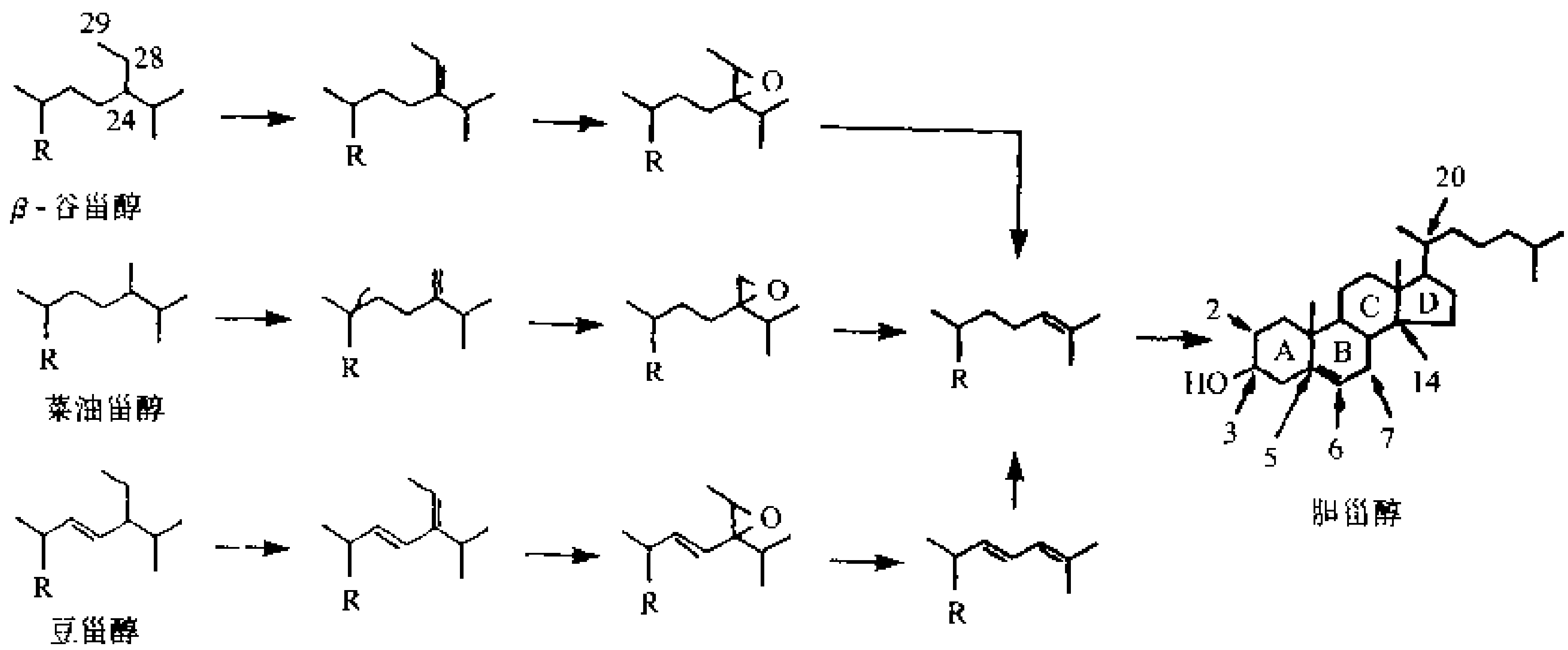



图 13-5 昆虫体内由植物甾醇到胆甾醇的代谢体系

($-CH_3$) 成为菜油甾醇 (campesterol), 或乙基化 ($-CH_2CH_3$) 成为 β-谷甾醇 (sitosterol)。谷甾醇的 21~22 烯基化就成为豆甾醇 (stigmasterol) (Koolman, 1990)。这些甾醇类进入昆虫肠壁细胞, 转送到体腔, 都能转换成蜕皮甾醇前体, 在这个代谢过程中 24 与 28 位间产生双键, 双键再氧化成为表氧化物 (环氧化物), 进而成为脱氢胆甾醇。脱氢胆甾醇再还原便成为胆甾醇。在血淋巴中与脂蛋白结合, 运送到体内必要的组织中, 主要是前胸腺 (Grienseisen, 1994)。

### 3.2 7-脱氢胆甾醇

脂蛋白运输的胆甾醇成为前胸腺合成了蜕皮酮的前体, 用放射性$^3$H 标记的胆甾醇喂食幼虫, 一定时间后抽提与分离得到$^3$H 标记的蜕皮酮, 由此证明了昆虫由胆甾醇合成了蜕皮酮。此后, 用前胸腺培养, 证明蜕皮酮合成过程中经过一个中间代谢物 7-脱氢胆甾醇。含$^3$H 的 7-脱氢胆甾醇在前胸腺培养液中生成$^3$H 蜕皮酮。分析表明, 在前胸腺中除胆甾醇以外, 还含有大量的 7-脱氢胆甾醇, 在家蚕体内, 含量随 5 龄幼虫的成长而变化。在前胸腺以外的组织中也检测到了 7-脱氢胆甾醇。由此可见, 7-脱氢胆甾醇是从胆甾醇到蜕皮酮的中间体。

家蚕和烟草天蛾前胸腺中, 由气相色谱测定, 除胆甾醇以外, 还检测到菜油甾醇或谷甾醇以及它们的脱羟基中间体。例外的是 24 位碳上的脱烷基反应。用菜油甾醇代替胆甾醇作为黄猩猩果蝇幼虫的饲料, 环腺中产生 20-脱氧马克蜕皮酮 A (20-deoxymakistrone A)。但是, 一般昆虫以胆甾醇为原料, 都经过 7-脱氢胆甾醇而合成蜕皮酮。

### 3.3 3-脱氢蜕皮酮

从实验确定 7-脱氢胆甾醇以后, 有一个中间代谢物是 3-脱氢蜕皮酮。蜕皮酮的无活性化合物之一是 3-表蜕皮酮, 蜕皮酮的 3 位碳的氧是 β 配位, 3-表蜕皮酮中 α 位异构化即丧失生理活性。通过测定, 前胸腺的培养液中用放射免疫技术 (RIA) 测定微量的蜕皮酮

（使用多种抗体）（Sakurai 等，1989 和 Kiriishi 等，1990）。研究烟草天蛾的前胸腺时用 H-22 抗体能识别甾醇 A 环的变化（左边第一个 6 碳环），但不能识别侧链的变化。3-脱氢蜕皮酮（A 环）与蜕皮酮之间并不表现交叉反应。以后又培养了烟草天蛾的前胸腺，其半量培养液用 H-22 抗体测定蜕皮酮的含量，将剩下半量中混合血淋巴蛋白，在加入蛋白质中不含蜕皮酮，测定蜕皮酮量约差 3 倍。由此说明，以同样实验不能识别变化了的 A 环，用其他抗体不能得到重复的结果。结论是烟草天蛾的前胸腺分泌的蜕皮酮的 A 环结构不同。此后证明这是 3-脱氢蜕皮酮。

在血淋巴中存在一种还原酶（3-脱氢蜕皮酮-3β-还原酶），但是否还原前胸腺分泌的脱氢蜕皮酮成为蜕皮酮还不清楚。体外培养昆虫的前胸腺，在分泌激素的昆虫血淋巴内含有原酶活性。该酶在不同目的昆虫之间具有一定的差异。在鳞翅目中，分泌的激素大部分为 3-脱氢蜕皮酮，但在家蚕中以蜕皮酮为主，在凤蝶（*Papilio xuthus*）中，3 脱氢蜕皮酮与蜕皮酮之比则因季节不同而异。测定结果表明，在家蚕的血淋巴中，3-脱氢蜕皮酮还原酶的活性很高，因此几乎没有 3-脱氢蜕皮酮。酶蛋白不但存在于血淋巴，还存在于血细胞、脂肪体或马氏管中，但酶活性以血淋巴中的最高。它的还原酶可能是由血细胞释放到血淋巴中的。另外，还原酶要求以 NADPH 为辅酶。测定家蚕血淋巴中的还原酶几乎无活性，只有加入 NADPH 后才显示出活性。说明家蚕血淋巴中存在酶蛋白，但一般情况下缺乏 NADPH。对烟草天蛾的血淋巴进行测定结果表明，具有还原酶活性，并在生长过程中活性有变化，加 NADPH 后会使活性增加数十倍。由此可见，烟草天蛾血淋巴中酶活性变化并不是酶蛋白量的变化，而是 NADPH 的供应量不同所引起的。3-脱氢蜕皮酮几乎没有蜕皮活性，像烟草天蛾那样分泌脱氢蜕皮酮的昆虫，要转化为有活性的蜕皮酮，NADPH 的供应是一个限制因子，但 NADPH 的来源至今还不清楚。

### 3.4　代谢的其他中间体

关于昆虫体内小分子的代谢过程，可用$^{3}H$或$^{14}C$标记物来识别。但研究蜕皮酮时，由于前胸腺太小而很难应用标记示踪，即使像家蚕那样较大的幼虫，1 对前胸腺的蛋白质量最大的还不到 20μg，在培养前胸腺时加入胆甾醇，得到的中间代谢物非常有限，而且前胸腺合成蜕皮酮后又直接释入血淋巴。用 100 对前胸腺，加入胆甾醇培养，得到中间体只能以纳克计量。因此，培养后的前胸腺很难测到蜕皮酮。前胸腺的活性需要 PTTH 的激活，才能大量合成蜕皮酮，而且中间体或蜕皮酮也并不积蓄在组织内。另外，用核磁共振（NMP）分析仪，最灵敏的才能分析出达到微克的纯物质。根据这个数量计算，需要有 10 万对前胸腺才能做 1 次试验，因此直接从前胸腺测定中间体或蜕皮酮几乎是不可能的。当前，探讨生物合成的中间体，已经有了更为灵敏的放射免疫方法。

以除去蜕皮酮的侧链或环上的羟基来研究这种甾醇的化学合成，是将$^{3}H$标记物注射到幼虫体内，取出前胸腺到培养体系中，一定时间后提取蜕皮甾酮，再提纯蜕皮酮或 20-羟基蜕皮酮，测定其中的放射性，发现$^{3}H$的摄取量很明显，再检验前胸腺中的化合物，由此探讨可能存在的中间体。结果表明，侧链的 25 碳、22 碳羟基，和 A 环 2 碳羟基的蜕皮甾醇，在体内以高比率转化为蜕皮酮与 20-羟基蜕皮酮，脂肪体中得到的结果与前胸腺的相同。这些部位的羟基化在 P-450 的作用下发生，它在前胸腺、脂肪体或马氏管等组织

中都有活性，25碳、22碳及A环的2碳羟基化不存在前胸腺的专--性。酮二醇虽然在家蚕与烟草天蛾中没有检测到，然而存在于飞蝗中，这是最有力的中间体补充者。其次是2碳、22碳和25碳的羟基化。缺14碳羟基的甾醇（5β-酮醇），它在前胸腺的培养系统中转变成14-脱氧蜕皮酮，最后成为蜕皮酮。在飞蝗中存在酮醇，但5β-酮醇作为蜕皮酮的合成的中间体可能只存在于植物中，并没有出现在昆虫的蜕皮酮合成过程中。根据这一事实，14碳的羟基化来自5，7-二烯（7-脱氧胆甾醇），至于蜕皮酮的中间体5β-胆甾-7-烯-6-酮（A环与B环为异型，即5碳的氢与10碳的甲基顺式配位），至今还是推测而已。

### 3.5 植物蜕皮甾醇的生物合成

蜕皮酮结构明确以后，植物中相继出现了很多有活性的蜕皮激素，估计植物蜕皮甾醇已达70种以上（Lafont and Horn，1989），其中对昆虫活性最强的是20-羟基蜕皮酮，还有白日青甾酮A（pinnasterone A），而牛膝甾酮（cyasterone）几乎无活性。此外，还有C环中有羟基的筋骨草甾酮（aiugasterone）等。植物中这些蜕皮甾醇含量较多，有助于搞清昆虫蜕皮酮的合成。

东京工业大学藤本善德教授的研究室用筋骨草培养细胞，用放射性同位素标记的乙酸与胆甾醇获得大量蜕皮甾醇，每次用1l的培养液，能得到足够供核磁共振分析的蜕皮酮。

## 第二节 蜕皮甾醇的代谢

昆虫体内依靠蜕皮激素的浓度变化，调节幼虫蜕皮、蛹变态和成虫分化等胚后发育。在昆虫的蜕皮和变态中，几乎所有生理变化都与蜕皮激素有关。各种生理活性依赖于不同的蜕皮激素浓度，在血淋巴中（阈值浓度）有几纳克到几百纳克的变幅。从末龄幼虫生长到进行变态，蜕皮激素以微小的浓度变化进行精密的协调，这从前胸腺的蜕皮酮的合成和分泌活动中可以反映出来。前胸腺分泌活动的调节机制有短时间与长时间两种方式。家蚕5龄幼虫期是前胸腺的分泌活性上升期，在1d内即可见到明显的波动。在蝗虫中，蜕皮激素分泌有不同的调节系统，前胸腺的调节因子有促前胸腺激素和抑前胸腺激素；JH对前胸腺同时成为正反馈作用抑制因子，但对神经系统起负反馈作用，调节蜕皮激素滴度的另一个因素则是它的代谢，其中包括贮存、分解和排泄。

### 1 代谢途径

Lafont和Connat（1989）曾经详细报道了蜕皮甾醇的代谢。在昆虫的脂肪体、中肠、马氏管和卵巢内都能进行代谢，其代谢途径可以概括为下列6种：

（1）20-羟化酶和26-羟化酶分别在20-碳和26-碳位上进行羟基化代谢。

（2）2、3和26-碳位上的氧化代谢。

（3）3-碳位上由还原酶产生的还原代谢。

（4）侧链上20/22-碳位上的酶切分解。

（5）2、3、22、25和26-碳位上的轭合合作。

（6）22和26-碳位上轭合物的水解作用。

在上述各种代谢作用中，以 20-碳和 26-碳上羟基化，醇酸的形成和 3-脱氢蜕皮酮的转型最广泛。在一些昆虫的消化道内，可能发生 3 种差向异构化和 14-脱羟基化。有时同一分子上可能同时发生几种不同的代谢反应。

## 2 轭合物的形成与水解

蜕皮甾醇轭合物有极性与非极性两类。在家蚕卵内蜕皮酮的极性轭合物含量很高，在蝗虫的卵巢和卵中，几乎只有极性轭合物，主要是 22-磷酸酯衍生物。在沙蝗滤泡细胞中发现有磷酸转移酶，为证实这种轭合物的代谢途径提供了依据。在烟草天蛾新产下的卵中，主要轭合物是 26-羟基蜕皮酮形成的 26-磷酸酯，而在海灰翅夜蛾（*Spodoptera littoralis*）中主要是 2-脱氧蜕皮酮的 22-磷酸酯。而在海滨伊蚊（*Aedes togoi*）中则形成硫酸酯，另有一些昆虫体内的轭合物是形成糖基化（图 3-7）。

黄猩猩果蝇的雌虫中，卵巢代谢活性很低，消化道内能合成蜕皮酮 22-脂肪酸酯，在离体条件下有很高的合成能力。当消化道中注射 3H 蜕皮酮以后，即可检测到放射性很高的极性轭合物，然而在离体组织内，腹部主要产物是 3-脱氢蜕皮酮。在血淋巴中可以见到所有的代谢物种类。

在蜱的卵巢和卵中的轭合物是非极性的。蜕皮甾醇形成 22-脂肪酸酯，这些脂肪酸酯中有亚油酸酯、棕榈油酯和油酸酯。在家蟋蟀和二点蟋蟀新产的卵内，却发现脂肪酸酯（Thiry and Hoffmann，1992），这些代谢物是蜕皮酮与 20-羟基蜕皮酮的双重轭合，由 22 和 25-碳位上极性或负电荷基团所形成。

## 3 代谢物的生理功能

蜕皮酮的代谢物有许多积极的生理功能，如蜕皮酮在 20-碳位上羟基化后，使分子呈现高度的蜕皮活性，在胚胎中蜕皮甾醇控制胚胎蜕皮，26-羟基化的蜕皮酮也有同样效果。蜕皮甾醇到轭合物的转化，更重要的意义是通过贮藏到排泄来调节激素滴度。轭合物的水解也有其独特的功效，特别是胚胎中前胸腺尚未形成之前，沙蝗极性轭合物在水解酶作用下，可为胚胎蜕皮提供一个激素源。因此，水解酶活性的升高和游离型蜕皮甾醇的增加是相联系的。在胚胎发育后期，极性甾醇（蜕皮甾醇的酸及其硫酸酯）水解特别明显。相反，在刚产下的卵内，几乎都是无活性的轭合物。此外，在蛹期也有相似的现象。因为多余蜕皮甾醇不能往外排泄，所以都转化为非极性轭合型贮存起来。在生长期或胚胎发生期再转化为游离型释出。例如，麻蝇由蛹期转入成虫期开始发育时，即从一种极性轭合物中释出 20-羟基蜕皮酮。在胚后发育期，昆虫通过消化道与马氏管排出过剩的蜕皮甾醇，同时以代谢酶灭活激素促进排泄，这对控制血淋巴中蜕皮激素的滴度十分重要。通常蜕皮甾醇的合成速率增加时，代谢和排泄速率往往也随之下降，促进血淋巴中激素滴度的上升。此外，植食性昆虫还通过消化道代谢外源性蜕皮甾醇。

## 4 靶细胞上的代谢

近年来研究者越来越重视蜕皮甾醇在靶细胞上的代谢（图 13-6）。Funder（1985）和 Labrie（1994）等人的研究证明，在血淋巴中激素的失活与活化的转变，羟基甾醇脱氢酶

（11β-HSD，3α-HSD，3β-HSD 等）和还原酶（5α-或 5β-）极其重要，但可能还有另一些酶与此有关。

在节肢动物中，许多靶组织都有 20-羟化酶参与活化过程，蜕皮酮氧化酶、3β-还原酶和一些羟化酶（即生物合成的终端羟化酶，如 2-，22-和 25-羟化酶或 26-羟化酶），作用于蜕皮酮分子的反应位点（图 13-7）。但对一些活性分子的特性了解得还不够，因此对于反应的理解也有局限性。

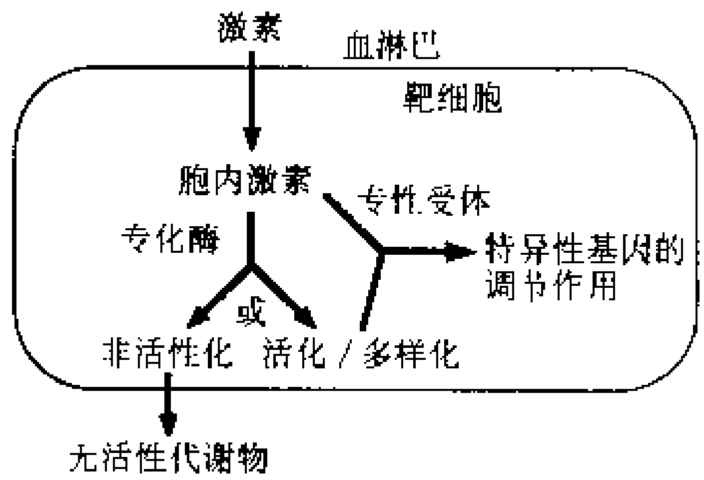



图 13-6 蜕皮甾醇在靶细胞上的代谢

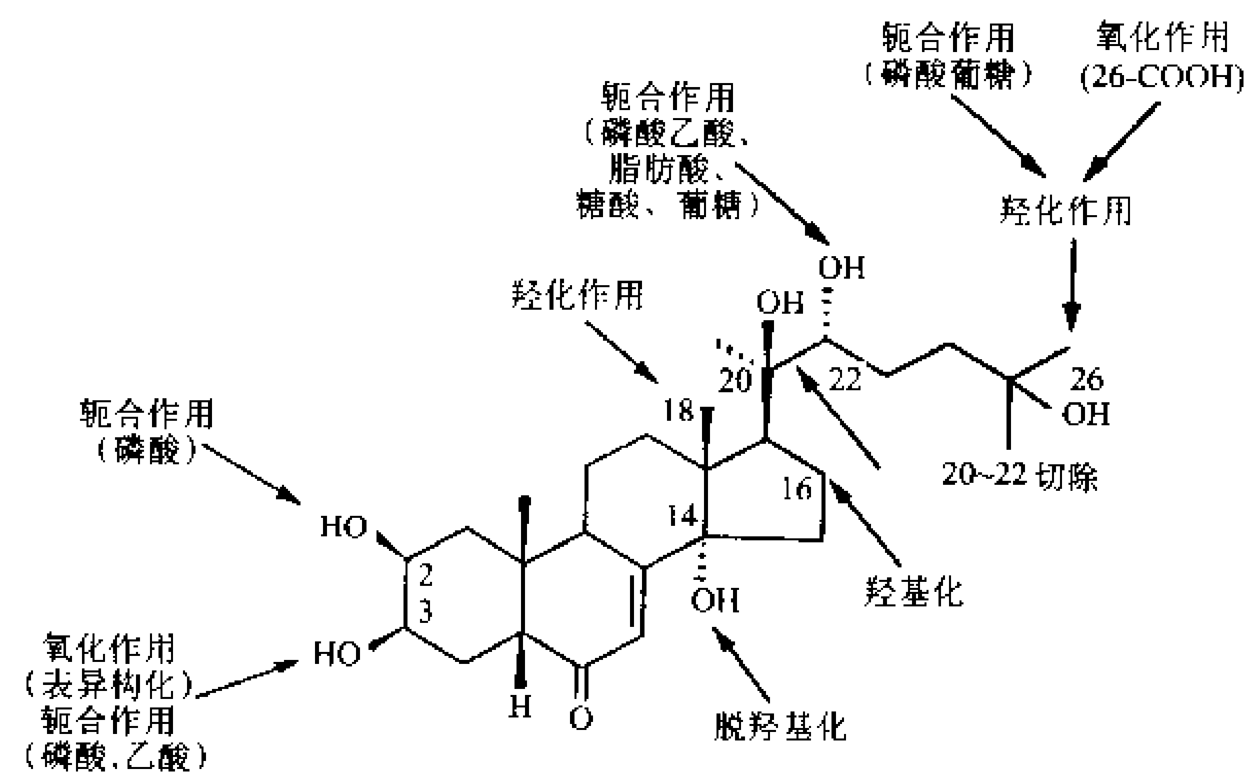



图 13-7 蜕皮酮分子的各种代谢反应位点

（仿 Lafont，1989）

## 第三节 蜕皮甾醇的功能

幼虫变态的发生和形成性成熟的成虫等一系列发育过程中，包括结构的再建和新功能的产生。这些过程都需要细胞的增殖和分化，以及一些细胞程序性的衰亡。在昆虫体内，这种发育过程主要是由甾醇类激素蜕皮酮及其活性代谢物 20-羟基蜕皮酮和半萜类保幼激素（JH）协调控制的（Riddiford，1996）。蜕皮甾醇不仅引发蜕皮，而且也是基因程序的开关，这是变态出现所必需的。然而，幼虫体内 JH 阻止昆虫组织对蜕皮甾醇产生变态所需的反应，所以，存在 JH 时只能引发幼虫—幼虫的蜕皮。在末龄幼虫期只有缺少 JH 时，蜕皮甾醇的升高，才能诱导变态。在很多昆虫中，例如果蝇那样高等双翅目昆虫，外源性 JH 不能阻止幼虫化蛹（或蛹的形成），仍然会出现某些皮细胞、神经系统、肌肉和唾腺的分化（Restifo and Wilson，1998）。

通过黄猩猩果蝇中 20-羟基蜕皮酮对唾腺线染色体膨突的诱导，Ashburner 及其同事

们发现 20-羟基蜕皮酮活化与协调了有关基因的转录因子和某些组织的特异性基因表达(Rusell and Rshburner，1996)。后来发现 20-羟基蜕皮酮对幼虫膨突的诱导并不受 JH 的阻制，JH 只能阻止预蛹期组织对蜕皮甾醇的感受性（Richards，1978）。Bayer（等 1996）报道了变态过程中一系列激素受体和转录因子在蜕皮甾醇开关中所起的作用。下面仅就蜕皮甾醇的生理功能作一概括性介绍。

蜕皮甾醇的主要作用是控制昆虫的周期性蜕皮，从而决定虫体大小和形态的变化。然而蜕皮甾醇还有许多其他重要的作用，尤其是在繁殖方面。例如，调控卵黄发生和精子发生，这些功能之间的联系并不明确，可能是不同基团的分子单独作用或共同作用的结果。Buckmanm（1991）使用多效性（polytropy 或 pleitropy）一词来说明蜕皮甾醇的多方面功能。

蜕皮甾醇对昆虫蜕皮、生长和繁殖（配子发生和形成）与保幼激素协调作用，特别是变态的发生与保幼激素的滴度变化关系十分密切。另外，蜕皮甾醇的存在是否起源于蜕皮需要，至今还不太清楚。因为大量不蜕皮的原始无脊椎动物体内也存在蜕皮甾醇，说明在进化早期它与蜕皮并无关系。

## 1　蜕皮甾醇与蜕皮

昆虫的蜕皮及其相关的生理活动受到蜕皮甾醇的调控。在幼虫发育时期，蜕皮甾醇不断合成和分泌，导致血淋巴中蜕皮甾醇浓度的变化。在全变态昆虫及半变态昆虫中，每龄幼虫蜕皮时蜕皮甾醇浓度都急剧增加，通常 20-羟基蜕皮酮的滴度在皮层溶离（旧表皮与皮细胞分离）前达到最大值，此后新表皮开始形成。在蜕皮时，滴度下降到最值低(Walgrave 等，1983)。Ampleford 和 Steel（1995）发现蜕皮甾醇滴度变化具 24h 节律，并受前胸腺中生物钟的调控。Cymborovski 等（1991）发现吸血蝽脑中释放 PTTH 的节律，看到幼虫到成虫连续生长 21d，在蜕皮时才显示出一个蜕皮甾醇峰。这一模式也出现在家蚕蛹的蜕皮过程中。很多鳞翅目幼虫末龄期存在两个蜕皮甾醇峰。第 1 峰较小，当时蜕皮酮和 20-羟基蜕皮酮的比例为 1∶1（Cymborovski，1992)。激素引起幼虫的行为变化，即停止取食和开始寻找合适的化蛹场所。第 2 个大峰引发幼虫皮细胞向蛹皮细胞转化，但该峰不存在家蚕中。第 2 个大峰与幼虫蜕皮化蛹有关，这与早期幼虫的单一大峰的情况相似。化蛹以后在成虫发育期尚有另一个高峰。如果蛹滞育，则蜕皮甾醇的峰延迟，到成虫重新开始发育时才出现。

一般幼虫蜕皮次数是固定的，但也可受到外界条件的干扰，如饥饿、寒冷或激素处理可以增加蜕皮次数。家蚕用蜕皮酮喂养以后，会出现 7 龄幼虫，但 20-羟基蜕皮酮无此效应。利用蜕皮激素的类似物干扰昆虫生长和蜕皮已被用于害虫防治中。

## 2　蜕皮甾醇与器官发育

长期以来，蜕皮甾醇被认为是一种控制蜕皮的激素。如前所述，在每次蜕皮周期中，20-羟基蜕皮酮在血淋巴中都出现峰值，而且蜕皮甾醇水平与皮层溶离以及蜕皮前后表皮层的分泌有关。然而，在蜕皮周期中，皮细胞并不是蜕皮甾醇唯一的靶组织，许多组织的重组都受蜕皮甾醇的调控。如变态中神经系统随着神经联络功能的变化而发生改变，新神

经的分化同时造成一些神经元的死亡。在烟草天蛾中，注射20-羟基蜕皮酮可阻止D-Ⅳ神经元和靶标肌肉的衰亡；也可用早期移去蜕皮甾醇的方法减弱死亡；随着注射时间的推迟，可阻止运动神经元的死亡和节间体壁肌的退化，表明它们直接受到蜕皮甾醇的控制。这种转变不仅在全变态昆虫中存在，而且也存在于半变态昆虫和其他节肢动物中。

大芭蕉卷叶弄蝶在化蛹时，20-羟基蜕皮酮关闭了马氏管的分泌作用，开始细胞重建。在分离的脂肪体中可以看到组织的自体吞噬，在有些种类中成熟的卵母细胞也在这时候产生组织的自体吞噬。

最近，在血淋巴中已经鉴定出很多蜕皮甾醇，并知道了蜕皮甾酮受体（ECR）及其异构体，它们同DNA接合蛋白形成异质二聚体。特异性受体的时空表达和不同配体之间形成复杂的结合。同时，不同的靶组织产生蜕皮甾醇的特异性代谢物能精确地调节发育模式（Huet等1993，Andees等1993）。Robinow等（1993）研究表明，神经元中的程序能使特异性受体的异构体的表达发生退化。

## 3 蜕皮甾醇与卵子发生

蜕皮甾醇在成虫体内的再现与生殖有关。卵巢受蜕皮甾醇的调控机制因虫种不同而异。卵巢合成的蜕皮甾醇能以共轭物进入成熟卵中并贮存在其中，当胚胎发育开始时从共轭物中分离出游离的蜕皮甾醇，激发胚胎蜕皮。但胚胎发育早期，蜕皮甾醇不出现峰值，也不引发胚胎蜕皮。Hagedom（1989）认为，卵巢合成蜕皮甾醇是在低等昆虫中出现的。Belles等（1993）指出，卵壳发生受20-羟基蜕皮酮的诱导，在蜚蠊中保留了这种原始功能。但蜕皮甾醇对卵巢发育的作用主要是触发卵母细胞的成熟和启动有丝分裂。

昆虫卵子发生，包括卵原细胞的有丝分裂和滤泡细胞的形成、卵母细胞的减数分裂、卵黄的积累和卵壳的形成等，所有这些都受激素的调控，当然其中也包括蜕皮甾醇以及保幼激素和许多肽类激素的协调作用。卵子发生的调控是一个复杂的问题，因为很多种类在成虫繁殖期已经停止蜕皮，前胸腺也退化了，这时是否由其他组织产生蜕皮甾醇调节生殖，就一直引起研究者的注意。有的昆虫卵黄发生是持续性的，有的则是周期性的，对那些成虫蜕皮的来说，卵黄发生在蜕皮间期或蜕皮之前，有些无脊椎动物可能发生在蜕皮间期，并有季节性交替现象。

向乳草蝽体内反复注射马克蜕皮甾醇A（24-甲基-20-羟基蜕皮酮），结果雌虫的产卵能力下降。将二点蟋蟀饲养在20℃亚适宜条件下，产卵率下降。反复注射2～5$\mu$g的20-羟基蜕皮酮，使雌虫卵巢重量增加，产卵率提高（Behrens and Hoffman，1983）。将老龄若虫的咽侧体摘除，结果蜕皮与变态正常的雌虫只产下少量可育的卵（即使在缺少JH的情况下）。注射20-羟基蜕皮酮到去咽侧体的雌虫体内，使血淋巴中Vg的滴度上升，产卵率不受影响，可见20-羟基蜕皮酮引发脂肪体合成Vg，并在进入血淋巴后使卵母细胞摄入Vg的量增加。去咽侧体的雌虫用20-羟基蜕皮酮与JH类似物联合处理，结果Vg滴度与产卵率都接近完整的对照雌虫。在很多双翅目昆虫中，蜕皮甾醇对雌虫生殖的影响因种类不同而有微小的差异。总的来说是卵巢分泌蜕皮甾醇进入血淋巴后，刺激脂肪体合成Vg（Bowres，1989）。

卵黄发生包括卵黄蛋白的合成其及在卵母细胞内的积累。有很多作者报道了蜕皮甾醇

对双翅目昆虫卵黄发生的调控，并且可能调控卵壳的形成。蜕皮甾醇刺激脂肪体中卵黄蛋白的合成，在少数昆虫中也得到有关 cDNA 和调控因子的信息。烟草天蛾卵黄蛋白基因的上游区与果蝇 YP 基因 H 区有 66% 相同，H 区的序列与脊椎动物雌激素应答因子（ectrogen response element，ERE）和果蝇编码热激蛋白基因的蜕皮酮应答因子（ecdysone response element，EcRE）的序列相似（Wang 等 1989）。在烟草天蛾的末龄幼虫体内连续注射高剂量的 20-羟基蜕皮酮（10μg/头），结果在脂肪体中诱导出卵黄原蛋白的基因转录。然而，果蝇和其他双翅目昆虫的情况比较特殊。在昆虫的其他目中，蜕皮酮并不控制卵黄蛋白的生物合成，这表明蜕皮酮的水平与卵黄发生大多无相关性。

蜕皮甾醇在雌成虫中，一般调控卵原细胞有丝分裂/减数分裂，而不是调控卵黄蛋白基因，这是 Bitsch 在 1988 年证实的。在衣鱼体内注射 20-羟基蜕皮酮，能够诱导滤泡细胞的形成并调控卵母细胞。在昆虫纲和甲壳纲中，蜕皮甾醇都引起它们的减数分裂再发生（Lafont，1987，1989）。

## 4 蜕皮甾醇与精子发生

有资料显示，雄虫体内的蜕皮甾醇水平低于雌虫，但精巢内的甾醇浓度较高。蜕皮甾醇对节肢动物精子发生的作用已有不少报道，证明蜕皮甾醇来自精巢围膜细胞，并可能控制精子的发生（Blomquist 等，1984；Dumser，1980）。在离体条件下，20-羟基蜕皮酮对飞蝗的精原细胞发生周期内抑制有丝分裂中 DNA 的合成（G2）。较为详细的报道是蜕皮甾醇参与了硬蜱（*Dermacentor variabilis*）精子发生的早期活动。

飞蝗末龄若虫在第 2～3d 时精细胞完成分化。当 JH 浓度下降时，蜕皮甾醇浓度上升，较高的蜕皮甾醇活性，促进雄虫生殖器官的成熟，并启动精子发生。在雄性二点蟋蟀中，雄性附腺与精包物质的释放，以及连续产生精包都需要蜕皮甾醇出现峰值。测定迁移蝗（*M. sanguinipes*）获得的结果表明，成虫羽化后第 2d 就有一个蜕皮甾醇小峰，第 3d 水平下降，这时精子进入贮精囊，两者有明显的相关性（Ismil，1995）。交配后精巢内蜕皮甾醇水平比未交配的增加 10 倍，增加的蜕皮甾醇可能是精巢新合成的，这对精子发生十分重要。在鳞翅目昆虫（如舞毒蛾）血淋巴中蜕皮甾醇在精巢释放精子前 1d 下降。Leeb 等（1984）指出，烟芽夜蛾雄蛾精巢内的蜕皮甾醇引导精子释放和产生性行为，并与精子成熟有联系。

## 5 蜕皮甾醇与细胞分化

表皮生长是昆虫蜕皮过程中的初始步骤。昆虫在皮细胞分泌表皮之前进行有丝分裂和增殖使虫体在蜕皮后得到增大。蜕皮甾醇的基本功能，是控制靶组织的细胞增殖和分化。化蛹前蜕皮甾醇瞬时上升，皮细胞产生有丝分裂（有的不产生有丝分裂），DNA 开始合成，然而在血淋巴中 20-羟基蜕皮酮达到峰值时，DNA 的合成和有丝分裂均告停止。停止在 G2 期的细胞在生理上是有活性的，能够分泌新的表皮，离体情况下高浓度的 20-羟基蜕皮酮作用于 G2 区，导致对蜕皮甾醇敏感的细胞有丝分裂停滞（Besson，等 1987）；另一方面，大量实验证明蜕皮甾醇触发 DNA 的合成和进行有丝分裂（Riddiford，1985），然而，20-羟基蜕皮酮是否控制这些过程还不十分清楚。早期研究表明，蜕皮酮是细胞分化

的刺激信号，可能与肽生长因子共同作用。

昆虫通过控制蜕皮激素调节基因的转录，证明从干细胞到分化细胞的整个发育阶段，皮细胞对蜕皮甾醇的敏感性的阈值不断增加。由于不同的代谢途径或靶组织细胞内受体分子不同，存在各种外源性蜕皮甾醇配体的专性作用（Talbot 等，1993）。

精子发生和前卵黄发生期卵母细胞的形成和生长都发生细胞分化，这种细胞分化是由蜕皮甾醇调节的。蜕皮甾醇能促进精巢和卵巢中精原和卵原细胞的有丝分裂，同时也促进雄性附腺细胞的有丝分裂。据早期报道，卵母细胞成熟时，减数分裂的重新开始，受来自母体的蜕皮甾醇的诱导（Lanot，1989）。

昆虫前胸腺分泌蜕皮甾醇与细胞周期性变化有关。在每一个蜕皮周期中，前胸腺都要经过细胞的分化或内倍化（endoploidization）。蛋白 S6 磷酸化作用使促前胸腺激素（PTTH）诱导前胸腺分泌蜕皮甾醇，这种磷酸化与有丝分裂有关。有丝分裂（或内倍化）又与蜕皮甾醇的分泌有关。许多与生长因子相似的分子（如家蚕素、飞蝗的类胰岛素或称小“PTTHs”）也有促蜕皮的活性，如同蜕皮甾醇类似物，有促进细胞内倍化或组织分化的作用（Delbecqune，1990）。

## 6 蜕皮甾醇的其他功能

在许多节肢动物中，发现蜕皮甾醇有性信息素的作用，如雌蟹在蜕皮期分泌蜕皮甾醇能够吸引雄蟹。雄蟹对 20-羟基蜕皮酮非常敏感，在 $10^{-12}$mol 的低浓度下就能引起它的前交配行为。Declerck（1983）用微克剂量的 20-羟基蜕皮酮喂食雄麻蝇（*Sarcophaga bullata*），不但使行为发生变化，交配频率下降，而且改变雌虫的食物选择。这可能通过调节神经系统产生作用。

据 Rachinsky 和 Engels（1995）的报告，蜕皮甾醇强烈影响蜜蜂（*A. melifera*）卵巢蛋白质的合成形式。研究结果表明，JH 是蜜蜂级型分化中“蜂王促成剂”。在蜂王形成过程中存在一个反应链。在外源性营养刺激下，首先，刺激咽侧体产生 JH。在蜜蜂幼虫 5 龄初期，随着 JH 滴度的提高促进前胸腺中蜕皮甾醇的产生，结果直接作用预蛹 DNA，调节其基因转录，向蜂王发育的代谢途径转化。因此使蜂群内出现蜂王。

# 第四节 卵蜕皮甾醇

1971 年大西英尔等从家蚕卵中检出蜕皮激素活性（Ohnishi 等，1971），其活性物质大多来自卵巢，说明卵巢是蜕皮甾醇的合成器官。1973 年 Kaplanis 等从烟草天蛾卵巢中分离到蜕皮甾醇，其主要成分是 26-羟基蜕皮酮，接着又从乳草蝽的卵中分离到马克甾醇 A（24-甲基-20-羟基蜕皮酮），以后在很多昆虫的卵巢中分离到蜕皮甾醇，至今已达 50 种以上。但卵巢中的和前胸腺的在代谢系统或生理作用方面有很多差异。因此，大西称前者为卵蜕皮甾醇（zooecdysteroids），称后者为前胸腺蜕皮甾醇（prothoraco-ecdysteroids），以资区别。

大西发现的卵蜕皮甾醇，与卵细胞成熟或胚胎的早期发生有关。在卵巢或卵内积累大量轭合型蜕皮甾醇（conjugate ecdysteroids）。蜕皮甾醇轭合型与游离型之间的转换反应了

酶系统及其调节机制，是饶有兴趣的生化研究内容。

## 1　卵蜕皮甾醇的生物合成与代谢

### 1.1　羟基化反应

如前所述，昆虫缺少合成甾醇骨架的酶，蜕皮甾醇是从食物中的胆甾醇开始合成的。但从胆甾醇到20-羟基蜕皮酮的转换需要：①导入7-碳位到8-碳位的双键（7-烯）；②甾醇A/B环的顺式的转换；③6-碳位的酮基（6-酮）的导入；④14-碳α位的羟基化；⑤2，20，22及25-碳位的羟基化。

在胆甾醇到20-羟基蜕皮酮的合成过程中，从同位素标记的胆甾醇或20-羟基蜕皮酮，由活体或离体反应的中间进行推测，并用HPLC分析代谢产物，以此研究为基础也说明：首先成为7-脱羟基甾醇，从7-脱羟基甾醇经过两个步骤，合成的化合物证实是5β-酮二醇与5β-二酮。前胸腺中形成5β-酮二醇或5β-二酮的主要顺序是碳25→碳22→碳2羟基化，蜕皮酮成为3-脱氧蜕皮酮。在前胸腺中，蜕皮酮20-羟基酶存在下，最终产物是蜕皮酮和3-脱羟基蜕皮酮。

卵巢-卵系统也以前胸腺同样的程序进行羟基化。前胸腺蜕皮甾醇与卵蜕皮甾醇的代谢系统中相比，特点在于：在卵巢-卵系统中，有蜕皮甾醇20-羟基激酶进行20-羟基蜕皮酮的合成，蜕皮甾醇合成体系的中间代谢产物大量积蓄。因此，形成共轭形式，特别是家蚕卵巢或卵中2-碳的-O位上羟基化的蜕皮甾醇（20-羟基蜕皮酮以外），2-脱氧-20-羟基蜕酮，2，22-二脱氧-20羟基蜕皮酮大量积贮。卵巢或卵中有前胸腺中不存在的合成路线，即20-碳位羟基化，也是从2-碳或22-碳的羟基化起始的。从20-羟基蜕皮酮的来源来看，25-碳→22-碳→2-碳→20-碳，25-碳→22-碳→20-碳→2-碳，25-碳→20-碳→22-碳→2-碳3种羟基化反应途径都存在，前二者在家蚕与沙蝗中是相同的。

园部治之等发现游离型卵蜕皮甾醇7种新的类型，它们的生物合成途径中最大的可能性氧原子导入不能脱离羟基化酶。在合成途径中，20-羟基蜕皮酮的生物合成，遵循25-碳→20-碳→2-碳→22-碳，进而成为20或25-羟基蜕皮甾醇，该途径用同位素标记前体物示踪得到了证实。

### 1.2　轭合型的形成与异构化

在家蚕中，确认构造的有13种轭合型蜕皮甾醇（大西研究组得到6种，园部研究组得到7种）。这些轭合型的磷酸化位置，限于2级羟基（2，3及22-碳），其间磷酸化的顺序：22-碳位中羟基磷酸化形成蜕皮酮22-磷酸。或在22-碳位中无羟基，以3-碳位中3β磷酸化成为22-脱氧-20-羟基蜕皮酮-3-磷酸酯；22-脱氧-20-羟蜕皮酮-3-磷酸酯。3α-异构体中2-碳位比3-碳位优先，磷酸化最后形成的是3-表-22-脱氧-20，26-二烯羟基蜕皮酮-2-磷酸酯。

与蜕皮甾醇的磷酸化有关的酶，到最近才得到证实。Kabbouh与Rees从沙蝗卵巢中分离的滤泡细胞，存在ATP和镁离子情况下，2-脱氧蜕皮酮被磷酸化，该酶称为2-脱氧蜕皮酮激酶，它是从cAMP或蛋白激酶（protein kinase）无抑制作用中发现的，说明这类

酶与蛋白激酶的调节作用不同。家蚕的卵或脂肪体的细胞质组分中也存在蜕皮酮、2-脱氧蜕皮酮，2，22-二脱氧基-20 羟基蜕皮酮的磷酸化酶。家蚕卵巢中各种蜕皮甾醇磷酸化反应是单一酶催化的，根据酶的基质特异性，家蚕的蜕皮甾醇磷酸化的位置是严格决定的，对于基质来说存在特异性的磷酸氧化酶。

卵巢或卵中，蜕皮甾醇的代谢产物是 3α-异构体，从 3β-蜕皮甾醇经过 3-脱羟基合成 3α-异构体。家蚕的卵巢或卵中并没有检出 3-脱羟基蜕皮甾醇，这是蜕皮甾醇的一种异构体，成为蜕皮甾醇氧化酶的限速阶段。3-表(α)-蜕皮甾醇的生物合成体系是非可逆的。这种蜕皮甾醇的异构体在家蚕中成为代谢的终端产物。

## 2 卵蜕皮甾醇的生理功能

昆虫体内蜕皮甾醇存在游离型以外，还有 2，3，22，25 及 26-碳位与磷酸葡萄糖、脂肪酸等结合形成轭合型。轭合型在生理上无活性，作为蜕皮甾醇暂时的贮存型，最终形成代谢产物进行排泄。

### 2.1 卵蜕皮甾醇与卵子形成

卵巢中合成的蜕皮甾醇与 JH 或脑的神经分泌激素等进行协同作用，支配卵子形成与产卵。但蜕皮甾醇的作用模式因昆虫种类不同而异。

在太平洋折翅蠊（*Diploptera puncutata*）中，从咽侧体分泌的 JH 促进脂肪体中合成的卵黄原蛋白。卵巢成熟时，滤泡细胞合成 20-羟基蜕皮酮，随即分泌到血淋巴中，20-羟基蜕皮酮抑制脑对咽侧体的作用。产卵后 20-羟基蜕皮酮解除对脑的抑制，使 JH 再次启动下一个卵形成周期。

吸血蝽（*Rhodnius prolixus*）与太平洋折翅蠊的情况相似，卵子形成受到 JH 的刺激。在卵形成时，合成的蜕皮酮分泌到血淋巴中，转变为 20-羟基蜕皮酮，促进脑激素（卵巢肌肉收缩有关的神经激素）的分泌，从而诱导产卵

埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）中，JH 影响到卵巢的发育程度，由脑分泌的卵发育神经分泌激素（egg development neurusecretory hormone EDNH）产生的刺激，使卵巢开始合成蜕皮甾醇。分泌的蜕皮酮进入血淋巴，转变为 20-羟基蜕皮酮，诱导脂肪体合成卵黄原蛋白。卵发育神经分泌激素（EDNH）刺激蜕皮甾醇的合成，因此又称为促卵巢蜕皮甾醇合成激素（ovarian ecdysteroidogenic homone，OEH）。

在飞蝗（*Locusta migratora*）中，卵形成需要 JH 与脑分泌的滤泡细胞刺激素（follicle cell tropic hormone，FCTH）的刺激。蜕皮甾醇在卵形成期由滤泡细胞合成，分泌到血淋巴中，再积蓄到卵细胞内。

在家蚕中，卵巢成熟于蛹期，成熟开始诱导前胸腺产生蜕皮甾醇，在成熟期卵巢内大量合成蜕皮甾醇。合成的蜕皮甾醇分泌进入血淋巴再向卵中移动并积蓄在卵内。

卵巢的滤泡细胞能合成的蜕皮甾醇，已从飞蝗的卵母细胞实验中得到证实。它在卵形成之际控制其减数分裂（Lafont and Connat 1989，Lafnot 等，1990，Swevers 等，1994）。在很多动物中，卵巢中卵母细细胞的第一次减数分裂开始后又会停止分裂，并且维持很长时间，在此期间，卵黄形成很活跃，卵母细胞发育成为巨大细胞。核增大（称为卵核胞）

使卵细胞形成特有的细胞形态。卵细胞不久受滤泡细胞合成的卵成熟诱导物（maturation-inducing substance，MIS）的刺激，进入第二次减数分裂，这时才具备有受精的能力。在这种减数分裂过程中，在两栖类与鱼类中，生殖刺激素（gonadotropic hormone，GTH）引起滤泡细胞中 MIS 的合成与分泌，但 MIS 因动物种类而异。

最近，在成熟的家蚕卵巢滤胞细胞中，发现了蜕皮甾醇受体的 mRNA，并研究了它的变化。在滤泡细胞中卵壳蛋白基因的转录调节因子与蜕皮甾醇受体的消长密切相关（Swerers 等，1994）。卵壳形成期（蛹的后期）前胸腺退化，血淋巴中已检测不到蜕皮甾醇的峰，由滤泡细胞自身合成的蜕皮甾醇起调控作用。但是，家蚕的滤泡细胞如何合成蜕皮甾醇还不十分明确。

## 2.2 卵蜕皮甾醇与胚胎发生

多数昆虫的卵在浆膜内形成，并分泌产生浆膜表皮。另外，胚胎成长时也分泌胚胎表皮。以后胚胎的表皮溶离（apolysis）而为薄层胚胎表皮所覆盖，这就是胚胎蜕皮。浆膜表皮或胚胎表皮的分泌与卵蜕皮甾醇的生理作用有关，这已成为许多研究者颇有兴趣的研究课题。

在飞蝗卵中，分泌浆膜表皮以后，连续出现 3 次胚胎表皮分泌期，它与蜕皮甾醇产生相一致（Laguenx 等，1979）。在折翅蠊（*Blaberus craniifer*）卵中，观察到在表皮分泌期卵蜕皮甾醇的量较低，反转期后，以马克甾醇 A（makisterone A）为主要成分，出现了 3 个峰值，其他各种昆虫的卵中，表皮形成与蜕皮甾醇变化的模式与上述昆虫中得到的结果相同，也就证明卵的游离型蜕皮甾醇诱导表皮分泌（Hagedom，1985，Shrenna，1991）。

然而，烟草天蛾、红头丽蝇（*Calliphora erythrocephala*）及家蚕中，是否都存在与胚胎表皮分泌相协调的蜕皮甾醇，现在还不了解。卵蜕皮甾醇诱导表皮分泌的直接证据也比较少。

## 2.3 卵蜕皮甾醇与胚胎滞育

家蚕在原肠胚期停止发生而进入滞育，但低温中长期暴露可以打破滞育。进入滞育期以后，用盐酸处理可以阻止滞育的诱导，从而使家蚕卵成为研究胚胎发生与代谢调控机制的极好材料。

大西英尔等认为，产卵后期不滞育的卵中蜕皮激素的活性高，滞育时活性下降，滞育以后可再次出现活性。上述变动反映了 2-脱氧蜕皮酮或 2-脱氧-20-羟基蜕皮酮游离型的存在，而轭合型几乎不发生变化（Mizuno 等 1981）。Coulon（1985）用盐酸处理非滞育卵使 20-羟基蜕皮酮增加，Gharib 等（1981）用 20-羟基蜕皮酮处理滞育卵，出现打破滞育现象。这些结果都说明家蚕滞育与蜕皮甾醇有密切的关系。

园部治之等对滞育开始前后的蜕皮甾醇代谢颇感兴趣，他们发现滞育与非滞育卵（产卵第 20d 以盐酸处理滞育卵和非滞育卵）中含有 9 种蜕皮甾醇，用 HPLC/RIA 比较了它们的代谢途径与变化动态（图 13-8）。

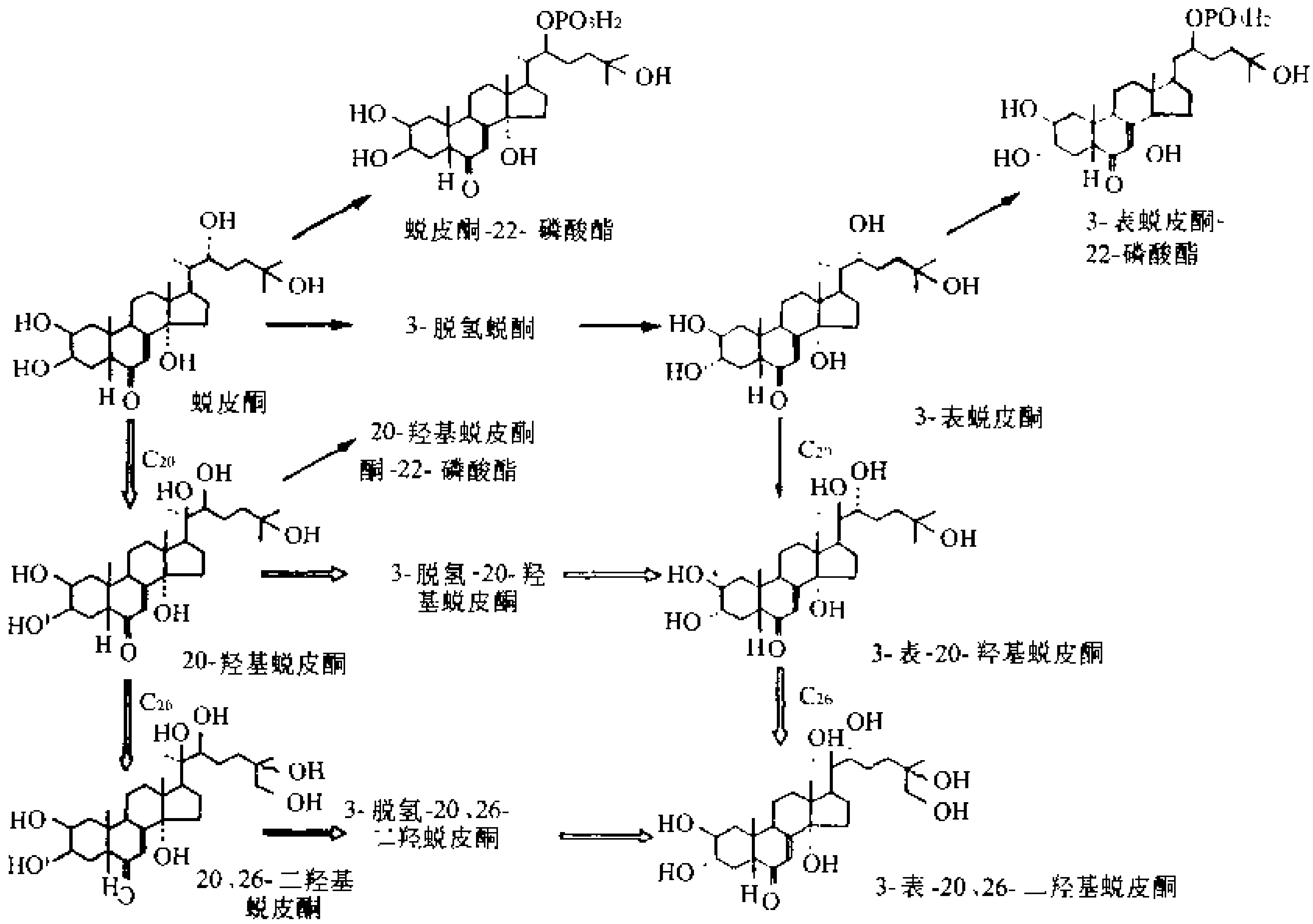



图 13-8 家蚕滞育卵与非滞育卵中蜕皮甾醇的代谢途径
黑粗箭头指滞育卵，白粗箭头指非滞育卵
（仿园部治之，1995）

## 第五节 蜕皮酮的受体

蜕皮甾醇对昆虫蜕皮与变态的调节，在分子水平上是如何进行的，这一直是研究者注视的焦点。自从 Clever 和 Karlson 在 20 世纪 60 年代发现蜕皮激素快速引起摇蚊（*Chiroormus tentans*）唾腺巨大染色体出现膨突以后，就认为激素进入细胞内即与受体结合，然后直接作用于染色体。在无激素存在的情况下，这些受体在细胞质内，与受体结合后即进入核内，再与染色体上 DNA 结合，在染色体上有 20 组基因对激素有反应，出现早期膨突之后又出现后期膨突。早期的在激素作用后几分钟就出现应答，后期的则在几小时后开始出现膨突。由此开始，几年来对蜕皮甾醇受体进行了研究，并取得了明显的进展。

### 1 蜕皮甾醇在细胞内的信息传递

Clever 和 Romball 在 1966 年先后用摇蚊和黄猩猩果蝇为材料研究蜕皮甾醇的作用机制。1970 年以后，Ashburner 等开始以基因出现为指标，在分子水平上探讨蜕皮甾醇的作用模式。发现脂溶性的蜕皮甾醇容易穿透细胞膜，经过一系列步骤，以脉冲方式快速激动

摇蚊唾腺的染色体膨突，先是引起基因群出现早期膨突，成为蜕皮甾醇的“直接”靶标，这一基因群已经得到分离。在此阶段中转录因子对基因的转录进行调控。同时，蜕皮甾醇对出现后期膨突的基因群产生抑制作用（图 13-9）。近年来的研究发现，特定的蛋白结合与蛋白受体结合形成异质二聚体。蜕皮甾醇与异质二聚体结合成为复合体，以后受体的特定区域与 DNA 结合。一些 DNA 对蜕皮甾醇蛋白复合体有很强的识别能力，从而诱导基因群进行转录。从蜕皮甾醇进入细胞开始，它的信号传递过程是：蜕皮甾醇与受体（ECR）结合—初期基因群出现膨突—后期基因群出现膨突—蜕皮甾醇的靶细胞产生反应而合成特异蛋白。ECR 在 19 世纪 70～80 年代得到分离和提纯（Bonner，1982），然而，受体与配体的特异性结合通过 Cherbas 等（1988）和 Luo 等（1991）的研究才获得了成功。

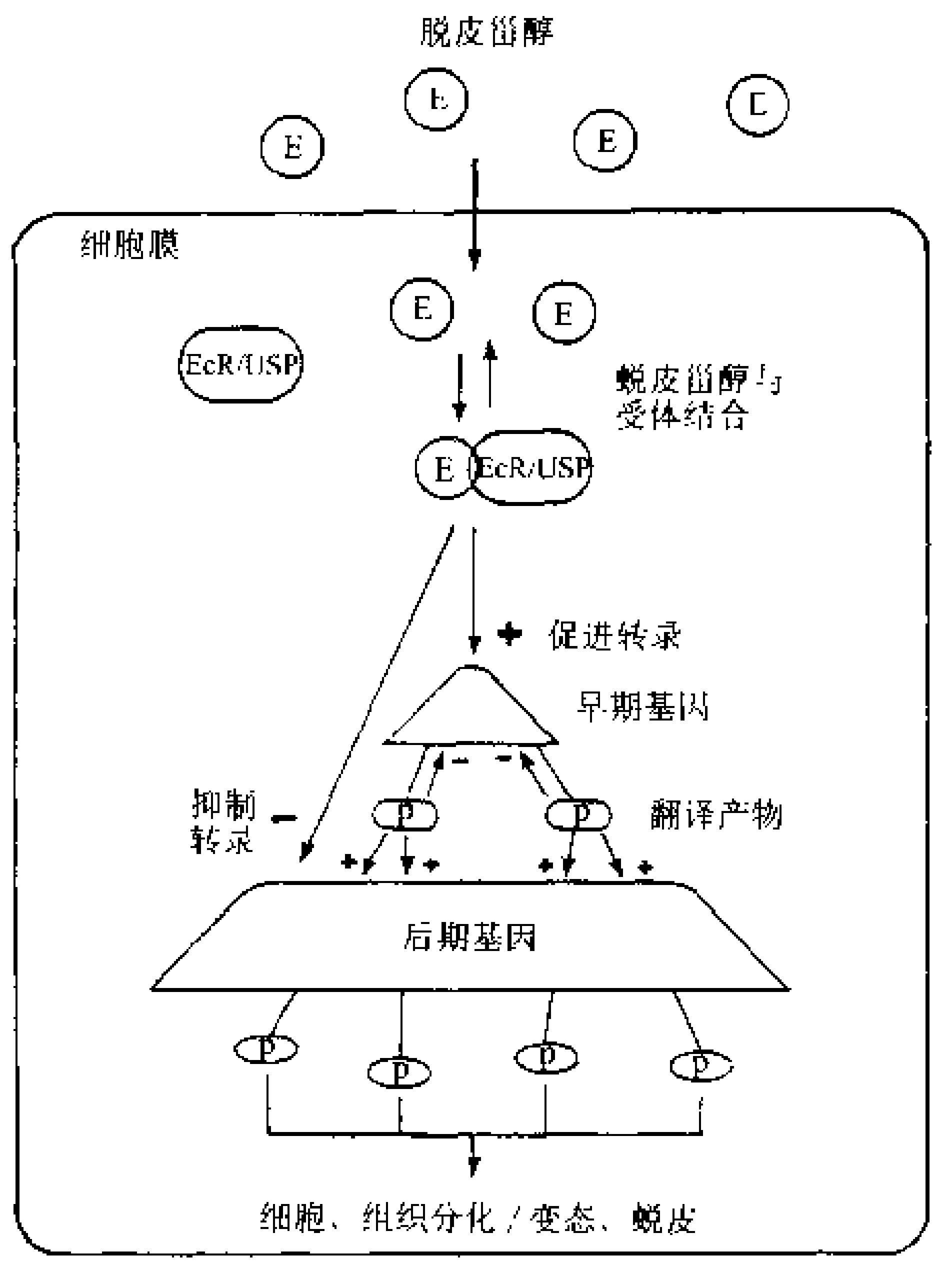



图 13-9　细胞内蜕皮甾醇的信息传递
（仿藤原晴彦，1995）

## 2　蜕皮酮受体基因的分离与鉴定

昆虫蜕皮甾醇受体的分离与鉴定，首先借鉴了脊椎动物甾醇受体的研究结果。早在 1980 年前后，基本搞清了脊椎动物的甾醇受体的结构。受体蛋白由 5 个区域，E 是配体结合区，也就是结合激素的部位，C 是 DNA 结合区，含有 2 个“锌指”（Zinc fingers，ZF1，ZF2），近 N 端 A/B 区是活性转化区，近 C 端有一个 F 区。不同生物之间或配体之间 C 区与 E 区的基本结构都很保守（图 13-10）。这种基因保守性与视黄酸（retinoic acid）受体（RAR）和甲状腺激素（thyroid hormone）核内受体很相似，它们同属核内受体超家族成员（Evans，1988）。

在 20 世纪 90 年代，根据昆虫甾醇类受体与脊椎动物甾醇类受体基因的相同性，最终从黄猩猩果蝇中分离到 ECR 基因。Hogness 等早在 80 年代后期对甾醇受体的基因进行了筛选，根据翻译产物中蜕皮酮应答因子（ecdysone responsive element），认定其获得产物是 ECR（以下称果蝇的受体为 DECR）。在培养的细胞中得到的受体，与作为调节因子的特异性结合蛋白—“过剩气门”蛋白（ultraspiracle protein，USP）形成了异质二聚体，并能与百日青甾醇 A 结合，确证了翻译产物是细胞内的蜕皮甾醇受体。

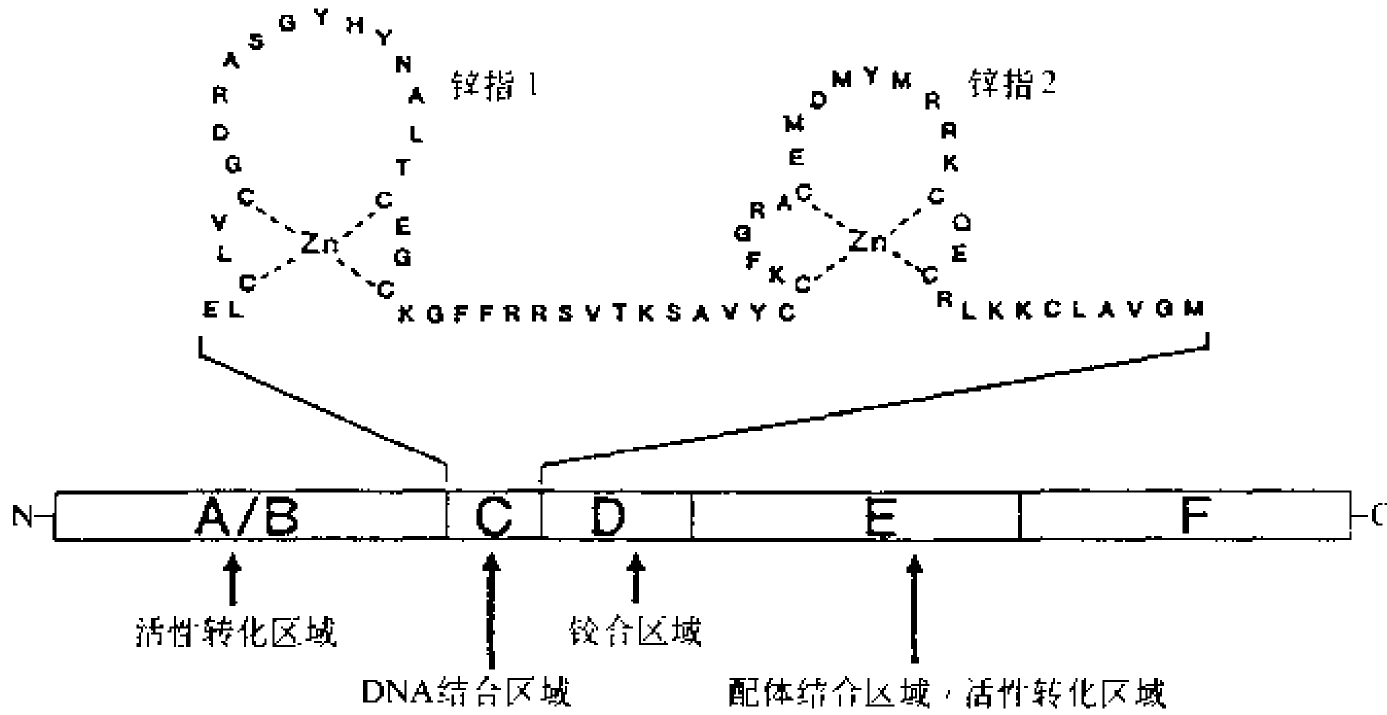



图 13-10 昆虫甾醇类激素受体蛋白结构

（仿 Schwabe 和 Rhodes，1991）

藤原晴彦在美国华盛顿大学 Riddiford 研究室研究了烟草天蛾的 ECR 的结构，并与其他昆虫的受体进行了比较，对此有颇为详细的报道。烟草天蛾 ECR（以下称 MEcR）从对应的受体蛋白 DNA 结合区与配体结合区的保守序列设计 DNA 引物，从皮细胞中得到的 mRNA 反转录 cDNA 进行 PCR，有一个 570 对碱基的带，MEcR 的 DNA 片断序列与 DE-

```
C region

MEcR     CLVCGDRASGYHYNALTCEGCKGFFRRSVTKNAVYICKFGHACEMDMYM
DEcR     ...............................S...C....R........
BEcR     .................................................

         RRKCQECRLKKCLAVGM
         .................
         .................

E region

MEcR     QEGYEQPSEEDLKRV-TQTWQLEEEEEEEETDMPFRQITEMTILTVQLIV
DEcR     ............R.IMS.P----D.N.SQ..VS..H...I.........
BEcR     ........D......-..S----D..D..SDL................

         EFAKGLPGFSKISQSDQITLLKASSSEVMMLRVARRYDAATDSVLFANN
         .......A.T..P.E........C.........M.....HSS..IF....
         ...................................S.......

         QAYTRDNYRKAGMSYVIEDLLHFCRCMYSMSMDNVHYALLTAIVIFSDR
         RS....S.KM...ADN.........Q.F..KV...E............
         K...........A.............FA.G.....F...........

         PGLEQPLLVEEIQRYYLKTLRVYILNQHSASPRCAVLFGKILGVLTELR
         ....KAQ...A..S..ID...I....R.CGDSMSL.FYA.L.SI.....
         ......S..........N...I..I..N...S....IY.R..S......

         TLGTQNSNMCISLKLKNRKLPPFLEEIWDV
         ...N..AE..F..........K........
         ..............................
```

图 13-11 几种昆虫甾醇类激素受体蛋白 DNA 结合区域与配体结合区域的氨基酸序列

MEcR. 烟草天蛾蜕皮甾醇受体 DEcR. 黄猩猩果蝇蜕皮甾醇受体 BEcR. 家蚕蜕皮甾醇受体

（仿东原和成，1995）

cR 有很多相同性，从这些片断中作出探针进行文库筛选最终获得双链 cDNA 基因克隆，从而分析了 MEcR 基因的结构（图 13-11）。

从 cDNA 的序列中可以看到，编码的产物是全长 556 个氨基酸，分子量 $63\times10^3$u 的蛋白质。

与脊椎动物核内的受体结构相似，MEcR 的 DNA 结合区域有 2 个锌指区域（2F1，F2），铰合区域（D 区）内有 α-螺旋构型（图 13-10）。C 区和 E 区的氨基酸序列与 DECR 的相当。最近与家蚕中分离到的 BEcR 进行比较，也具有明显的相同性，与摇蚊等 4 种昆虫比较，ECR 蛋白质的各个区域、全长、分子量、DNA 结合区（C 区）与配体结合区（E 区）的长度及序列都是相同的，值得令人注意的是 A/B 活性转化区域有异构体。分离到的 MEcR 的 A/B 区与 DECR 的 B1 型相似。在烟草天蛾、家蚕和黄猩猩果蝇中同样存在 A 型异构体（表 13-3）。

表 13-3 ECR 中各区域氨基酸序列长度和相同性比较

| 区域 | MS | DM | BM | CT |
|---|---|---|---|---|
| A/B | 146 | 263（50） | 146（80） | 114（55） |
| C | 66 | 66（95） | 66（100） | 66（97） |
| D | 92 | 101（34） | 91（76） | 109（48） |
| E | 225 | 222（70） | 221（88） | 223（70） |
| F | 27 | 226（<10） | 19（44） | 24（19） |
| 全长 | 556（B1） | 878（B1） | 543（B1） | 536 |

注：1. 引自藤原晴彦（1995），括号数字示各种昆虫与烟草天蛾相比，ECR 氨基酸序列的相同百分率

2. 表中代号：MS. 烟草天蛾 DM. 黄猩猩果蝇 BM. 家蚕，CT. 伸展摇蚊。

用免疫化学技术发现，MEcR 蛋白存在于细胞核的内部，与 ECR 是核内受体的假说是一致的。Koelle 等（1991）用黄猩猩果蝇进行试验，也证实当不存在蜕皮甾醇时，ECR 是存在于核内的。

## 3 蜕皮甾醇及其受体的作用模式

Clever 和 Karlson（1960）首先阐述了蜕皮甾醇诱导果蝇多线染色体膨突的周期性程序，以后 Ashurner（1974）发展了这些研究成果，并在此基础上用离体和活体试验建立了作用模式。蜕皮甾醇及其受体的复合体启动调节因子正负双向调节，激活蜕皮甾醇。甾醇类激素进入细胞内与受体结合，然后直接作用于染色体。但在没有激素时，有些受体存在于细胞质中（如糖皮质激素受体），有的则存在于细胞核中（如雌激素和甲状腺激素的受体），一旦有激素存在时，这些受体都出现在细胞质内。

昆虫蜕皮甾醇受体就是一种核内受体，作为与特定 DNA 序列结合的蛋白质，先形成二聚体后，再激活或抑制有关基因。这些蛋白有 66 个氨基酸序列构成的 DNA 结合区域，大多是非常保守的，其中两个锌指，每个都连接 4 个胱氨酸残基。雌激素和糖皮质激素的受体 C-端的锌指参与二聚体的形成，并能和其他核蛋白相互作用，N-端锌指的 3 个氨基酸和 DNA 结合。激素与受体 C-端的配体结合区域结合。诱导无配体的受体进入核内，并引起 DNA 与激素—受体复合体结合。C-端区的序列对激素—受体复合体二聚化及活性转化

有重要作用，N-端则对活性转化起关键作用。但在不同的异构体中，它的功能是不同的。

甾类激素—受体复合体能激活或抑制那些含激素应答因子的特殊基因。在没有激素的情况下，甾醇类受体可能抑制某些基因（这些基因在有甾醇类激素时被活化），它们通常按不同空间分成两个5～6bp的半位点结合，以“回文”序列形成同质二聚体（也有直接重复的），另有些异质二聚体（如视黄酸样X受体）。如同甲状腺激素和视黄酸受体相互反应能提高后来的转录活性，这种异质二聚体能以“合成物”在应答因子上与其他类型的转录因子结合，这样就极大地增加了细胞内信息通道之间的反应潜力。激素—受体复合体除了与DNA结合时相互作用以外，不同类型的转录因子可能在蛋白质水平上相互作用，改变转录复合体的性质，或与别的因子竞争DNA，最终与DNA结合。

甾类激素—受体复合体还能改变染色体的结构。例如，改变DNA酶的过敏感位点。此外，甾类激素能调节特定的mRNA的稳定性。Mckenzie和Knowland（1990）证实，雌激素对鸡肝中卵黄原蛋白mRNA有稳定作用，这可能是由于激素的药理学上剂量产生的效果。

### 3.1 从幼虫到预蛹期

ECRmRNA的量因虫期和组织不同而异。它的转录在时空两个方面受到调节。Fujiwara等（1993）对ECR的发生模式进行了详细的研究，为防止其他甾醇受体的干扰，在探针中，对铰合区（D区域）进行Northern杂交印迹分析，再从末龄幼虫到成虫各时期组织中mRNA的出现进行了定量测定。

从烟草天蛾幼虫期到预蛹期，在翅原基与前胸腺中MEcR的出现存在不同的模式。在组织中，5龄蜕皮前后2日内MEcR的量很少，第2日以后开始上升，到预蛹期（5龄第5日＝漫行第1日）出现峰值，在体壁中也观察到同样的趋势（Riddiford，1994）。在烟草天蛾中，从幼虫到蛹之间蜕皮甾醇峰值变化是与化蛹相应的，在蜕皮甾醇浓度低下时，MEcR也随之下降，但在出现低浓度的转换时，存在蜕皮甾醇急剧诱导的可能性。烟草天蛾在预蛹期前2d即停止取食（5龄第4日＝W0，漫行期），从W0到W1 MEcR出现高峰，与预蛹形态的产生相对应。前胸腺中与翅原基或体壁中不同，一旦被诱导以后，MEcR的出现直到蛹期都不下降，这种特定的模式表明前胸腺是合成蜕皮激素的组织，它的合成调节与ECR相联系（Sakurai and Gilbert，1990），这与黄猩猩果蝇ECR出现的特定模式相似。

进入预蛹期，蜕皮甾醇的浓度急剧上升，这时前胸腺以外的组织MEcR的发生量明显下降，这一变化与5龄第2日出现转录诱导相应对。高浓度的蜕皮甾醇对转录产生抑制。甾醇类受体族中，另一种激素受体MHR3诱导初期基因（或初期/后期）（Palli等，1980），在体壁中能见到同样的模式，而且MHR3的转录需要较高的蜕皮甾醇的诱导。

ECR的转录是在蜕皮甾醇低浓度时出现的，这在前面已经作了陈述，特别是对形态起决定作用的峰，受到低浓度甾醇的诱导。Riddiford等曾对体壁进行培养，在受体峰值出现时，虫体内20-羟基蜕皮酮浓度接近25ng/ml的低值，但诱导了ECR的转录；而诱导MHR转录只需1/20的量已能出现反应。另外，对ECR的转录诱导，20-羟基蜕皮酮的灵敏度比蜕皮酮高10倍。

### 3.2 蛹期

在烟草天蛾的翅内，MEcR 在化蛹后第 3～4 日和 7～8 日出现两个高峰，在烟草天蛾化蛹后第 5 日，成鳞细胞和毛窝细胞进行分化，在第 8 日鳞片形成，当第 2 个峰出现时，翅的形态即告完成。

Gibert 等研究了蛹血淋巴中蜕皮酮和 20-羟基蜕皮酮的浓度变化，与 MEcR 的两个峰出现的模式是一致的。蜕皮酮由低浓度开始上升时，诱导第 1 次转录，浓度下降时又诱导第 2 次转录。每次蜕皮酮浓度升高时都出现 ECR 被抑制现象，相反诱导了 MHR3 的峰值。随着蜕皮酮与 20-羟基蜕皮酮峰值的出现，先后出现两个 MHR3 的高峰。在后一个高峰出现时，无疑 20-羟基蜕皮酮替代了蜕皮酮。

另外，烟草天蛾幼虫在短日照条件下饲育，蛹蜕皮后即进入滞育。这种蛹的 ECR 与非滞育蛹的要迟 3 个月，以后随滞育的解除才出现 ECR。原因是滞育期缺乏 PTTH，导致蜕皮甾醇水平下降而 MEcR 不能出现。如果对滞育蛹注射蜕皮甾醇，无论蜕皮酮或 20-羟基蜕皮酮都能解除滞育，在滞育 20 日后就羽化为成虫，这时 MEcR 出现的情况与非滞育的相似，都在翅内产生两个 ECR 峰。但蜕皮酮与 20-羟基蜕皮酮有微妙的差异。蛹翅内两个 ECR 峰的出现对形态发生具有重要的作用。

## 4 蜕皮甾醇受体的复杂性

### 4.1 蜕皮甾醇受体的异构体

黄猩猩果蝇的 ECR 至少有 3 种异构体（Talbot 等，1993），分别命名为 A、B1 和 B2。从气门得到的受体中发现，异构化发生在 N 端 A/B 区域内，不同异构体与调节转录有关，它们在各种组织中的命运都不一样。形成围蛹时幼虫组织或神经细胞中 B1 型较多；在形成成虫时，成虫原基等组织中则以 A 型占优势，不同受体直接或间接决定组织分化的方向。在鳞翅目昆虫（如烟草天蛾和家蚕）体内，有与 DECR 相同的 A 与 B1 型。说明几种全变态昆虫中 ECRA 异构体的 A/B 区域是相同的。

### 4.2 第二受体蛋白

ECR 具有高度的多样性和复杂的作用机制。在脊椎动物体内，受体以外还有许多具受体性质的蛋白，相互之间形成同质二聚体或异质二聚体。视网酸受体的一种 PXR 就是很多甾醇类受体形成异质二聚体的共同伴侣，可以视为第二受体蛋白。在黄猩猩果蝇中，PXR 的同源物“过剩气门蛋白”（USP）与 ECR 形成异质二聚体，但受体与二聚体的出现，还有许多复杂的因子，其中包括受体的异构体和转录因子、ECR 基因在染色体上的数量，以及与 USP 的相互作用。此外，还有许多配体不明的“孤儿受体”（orphan receptors）与非甾醇受体转录因子的相互作用，甚至与 JH 的相互作用。这不但反映了甾醇类受体超级基家族的结构与机能在进化过程中的关系，同时也启示我们有许多问题需要继续深入研究。其中包括上面所说的各种受体与配体之间的关系和它们之间竞争性，以及影响调节转录的因子等等，从而构成了蜕皮甾醇调控生长发育的复杂性机制。

近年来报道，蜕皮酮诱导蛋白（ecdysoneinduced proteins）种类很多，它们作为转录因子受到重视。如果蝇 E78、E75、E74 和激素受体 3（DHR3）、烟草天蛾的激素受体 3（MHR3）和 E75B、森林天幕毛虫（*Nalacosoma disstria*）激素受体 3（MHR3 类似物）和激素受体 2（E75 类似物）（Sohi 等，1995）。

Segraves 和 Woldin（1993）首先从烟草天蛾中分离到 E75 基因，其结构与果蝇 E75 基因相似，并且获得异构体 E75B 的 cDNA。周保华等（Zhou er al，1998）又获得了烟草天蛾的 E75A 异构体，与 E75B 相比，虽然 E75B 缺少一个锌指，但结合区的核苷酸序列基本相同，只是 845 位上 C 换在 T，并且与大蜡螟的 GmE75A（Jindra，er al，1994）和棕色卷叶蛾 CfE75（Palli et al，1997）也基本相同。但烟草天蛾 E75A 转录单位只有 16kb 长，这是果蝇 DmE75a 中的 1/3。研究结果表明烟草天蛾的 E75 与果蝇的 E75 有明显的同源性，A、B 两种异构体在幼虫和蛹的蜕皮时腹部皮细胞中都有发现，但前者早于后者。

果蝇 ECR 中已发现的 3 个异构体，共享 DNA 结合区和配体结合区，只是 N 端活性转换区有差别。这些异构体的质量和数量在组织与龄期方面都表现出一定的特异性。例如，在果蝇神经系统中，一个异构体控制变态的发生，当变态过后又出现相同或不同的异构体。异构体及其在蛹与成虫发育中出现的时间都会影响细胞的命运，然而许多关系尚未完全搞清。

### 4.3 受体蛋白的基因调控

从蜕皮甾醇引起摇蚊和果蝇唾腺巨大染色体膨突的现象中看到甾醇类物质能直接作用于基因，激活或抑制基因的一连串反应，由此形成了最早的蜕皮激素作用模式。如前所述，蜕皮激素与受体结合有选择地调节靶标基因。第 1 个反应是促进早期基因的转录，而抑制后期基因的转录。早期基因结合一个或多个调节蛋白，这些调节蛋白通过抑制早期基因和激活后期基因而诱发第 2 个反应，从而导致一系列蛋白质的合成。

近来从克隆出果蝇的蜕皮激素受体中知道，ECR 作为一个超级家族成员，有趣的是 ECR 与另一个成员 USP 形成二聚体，它们能与标记的蜕皮甾醇和 DNA 序列结合。这些 DNA 序列包括一个已知的蜕皮激素应答因子。免疫化学分析证明 ECR 与早期和后期染色体膨突位点结合，证实了早期 Ashburner（1973）假设的作用模式。

已发现的几个果蝇等一些昆虫蜕皮甾醇诱导蛋白受蜕皮激素应答基因编码，如 E75 和广泛复合体（broad-complex，BRC）应答基因能编码多个 DNA 结合蛋白。在鳞翅目中发现了相似的蜕皮激素诱导蛋白，每次蜕皮都诱导它们的 mRNA，这些 mRNA 并无龄期特异性。但 BR-CmRNA 首先出现在变态时期，从这一点看，似乎又存在某种龄期特异性。DNA 结合蛋白通过转录因子调节蜕皮甾醇的第 2 个反应。不同的激发子和不同的结合点会引出不同的异构体，而一个特定异构体的出现时间就决定于它的转录的长度和激发子对蜕皮激素的敏感性。

虽然一些转录因子会暂时出现在不同组织中，甚至特定组织的细胞内，但它们并无组织特异性。例如，烟草天蛾 4 龄幼虫的第 5 腹节甾类激素受体超家族中的一个成员——MHR3，最先出现在前足趾钩的表皮上，然后在节间膜区域内，最后在蜕皮激素出现高峰后 12～15h，为 5 龄蜕皮作准备时，都出现在黑斑区域中。如果延迟 6～8h，这种情况很

像前胸腺分离时出现的蜕皮状态，估计这种状态反应了蜕皮激素上升时细胞内所含数量差异，可能与龄期和组织特异性因子联合作用，就像与ECR结合在一连串反应中激活或抑制靶标基因。

据周保华等（Zhou et al，1998）报道，烟草天蛾4龄与5龄皮细胞接触20-羟基蜕皮酮后3～6h即出现E75ARNA的峰值，但以后24h一直保持低水平。蜕皮甾醇直接诱导了转录基因的表达，JH在4龄幼虫皮细胞提高了20-羟基蜕皮酮的敏感性达10倍左右。在5龄幼虫的皮细胞中，蛋白合成的抑制剂异霉素（anisomycin）对诱导无抑制效应。E75ARNA虽受20-羟基蜕皮酮的直接诱导，但其下降调节受制于蛋白质的合成。5龄2d的幼虫皮细胞存在JH1情况下，20-羟基蜕皮酮的诱导作用受到抑制，结果表明，E75A是保持幼虫表皮细胞所需要的。

周保华等（Zhou et al，1998）还报道了作为转录因子广泛复合体（BRC）$RNA_3$，在20-羟基蜕皮酮诱导下，在烟草天蛾腹部背面皮细胞中的细胞内的表达受到JH的抑制。

调控基因表达的著名例子是依赖于蜕皮甾醇的昆虫表皮黑化。在烟草天蛾幼虫蜕皮前，蜕皮甾醇的滴度迅速下降，从而调节多巴脱羟酶（DDC）基因的表达，最终通过DDC的合成并形成黑色素（melanin）（Riruma and Riddiford，1993）。Koch（1995）指出，鳞翅目翅上鳞片的颜色生成是受20-羟基蜕皮酮调控的，与烟草天蛾表皮有相似之处。在翅的色彩型式中，不但有时间依赖性，而且有DDC的特异性表达模式，这是对蜕皮甾醇不同反应调节的结果。

周保华等（Zhou et al，1998）分离到烟草天蛾的广泛复合体（BRC）基因，它的N-端BTB区域（蛋白质与蛋白质相互作用区）与果蝇的BRC相同，作为转录因子对烟草天蛾幼虫变态发生起开关作用，只有在20-羟基蜕皮酮诱导BRC基因得到表达时，成虫器官芽才能开始在幼虫体内得到分化。但JH的存在阻碍20-羟基蜕皮酮对5龄幼虫BRC RNA3的诱导。因此BRC基因表达是昆虫变态发生所必需的。这一发现为了解激素调控变态提供了关键性知识。当然JH如何阻遏BRC基因的表达还需要进行进一步研究。

### 4.4 受体抑制剂的利用

针对蜕皮甾醇与受体之间亲和性，Wing等（1988）发现一些二苯基甲酰类化合物（如RH5849和RH5992）能与ECR结合，因此可作为非甾醇类颉颃剂，调变蜕皮甾醇与受体的亲和性，干扰受体的功能，并且诱导MHR3的表达。但抑制DDC和幼虫表皮蛋白LCP14的产生（Retnakaran et al，1995）。在棕色卷叶蛾（*Choristoneura fumiferana*）中肠、皮细胞和脂肪体中，RH5992诱导CHR3mRNA的表达（Palli et al，1995）。当一定的甘蓝甾醇（brassinosteriods）遇到蜕皮甾醇受体时，便与蜕皮甾醇竞争结合位点（Kanser，1990）。甚至当甘蓝甾醇用于昆虫活体时，就可以看到抑制蜕皮的效果，这启示研究者在寻求抑制昆虫蜕皮的化合物时，不要忽视这一条可以利用的途径。

## 5 结论

通过研究果蝇中蜕皮甾醇受体以及它的异构体，发现它的活性二聚体需要由蜕皮甾醇诱导的转录因子，才能控制蜕皮和变态。特定组织的结构基因是否受蜕皮甾醇调控，首先

取决于此组织中当时是否具有蜕皮甾醇受体。如果有受体，蜕皮甾醇就能诱导转录因子。转录的形式取决于蜕皮甾醇的浓度，也可能取决于某种组织。然后在转录因子和（或）作为蜕皮甾醇诱导的级联反应中，依次与组织特异性因子共同调控结构基因，或与蜕皮甾醇—蜕皮甾醇受体复合物共同作用，进行调控。

果蝇的蜕皮甾醇受体至少有 3 种异构体，这 3 种异构体仅在 N-端有所不同，它们对于基因的反激活非常重要。在组织中，这些受体异构体随着发育进程的不同而改变。因此，不同的异构体可能调控着不同的基因，也可能调控同种基因。

无论是幼虫、蛹还是成虫，在每次蜕皮时大多数已知的蜕皮甾醇诱导的转录因子都会被激活。在变态时也至少有一种被激活。然后这些转录因子就会在一种多态组织中调控不同阶段的基因，并且在各种成虫组织的前体细胞和器官芽中启动而产生差异。另外，在由交替连接或交替启动时，在所产生的多种形式中，会发现蜕皮甾醇受体的新异构体和它们的转录因子，从而会进行大量组合来调控特异性基因，最终使昆虫发生形态变化完成变态。

# 第十四章 昆虫的保幼激素

自从 Wigglesworth1934 年发现保幼激素（JH）以来，它就被认为在昆虫变态和生殖调节中起关键作用。虽然最初判断 JH 是由脑分泌的，几年以后 Boungiol 和 Wigglesworth 证明是由昆虫头部脑后的 1 对咽侧体分泌的。JH 已被分离并化学鉴定为倍半萜类激素。现在知道由于侧链长度或环氧化不同，存在几种不同结构的 JH。在鳞翅目中发现了 JH0、JHⅠ和 JHⅡ，在大多数其他昆虫中发现了 JHⅢ在高等双翅目中存在 JHⅢ双环氧化物，在蜚蠊胚胎和幼虫中发现了少量的甲基法呢醇，它是 JHⅢ的直接前体。另外，一些小的亲脂分子（如视黄素）也能模拟这些天然激素的作用。当前对这些亲脂小分子在器官水平上的生物学作用有较多的认识，但细胞水平和分子水平的作用还知之甚少，例如，昆虫纲中为什么有这么多种类的 JH，它们与蜕皮激素是如何协调基因表达的等。

## 第一节 保幼激素的合成与代谢

保幼激素（JH）的化学结构首先是由 Roller 等在 1967 年确定的。他利用质谱、核磁共振和微量诱导技术，证明 JHⅠ（18 碳-JH）属倍半萜类，在分子的一端有一个环氧基团，另一端有一个甲基酯 以后在昆虫和甲壳动物中陆续发现了 7 种有保幼激素活性的类似物（图 14-1）。

JHⅡ（17 碳-JH）是 Meyer 等 1968 年鉴定出来的，JHⅢ（16 碳-JH）是由 Juby 等在 1973 年发现的。JHⅢ是直翅目、鞘翅目、半翅目和膜翅目昆虫的主要 JH，而鳞翅目中主要是 JHⅠ和 JHⅡ的混合物。JH0 和 4-甲基-JHⅠ是在烟草天蛾的卵中发现的。在某些鳞翅目雄虫的咽侧体中还能分泌JH酸（JHAⅠ、JHAⅡ、

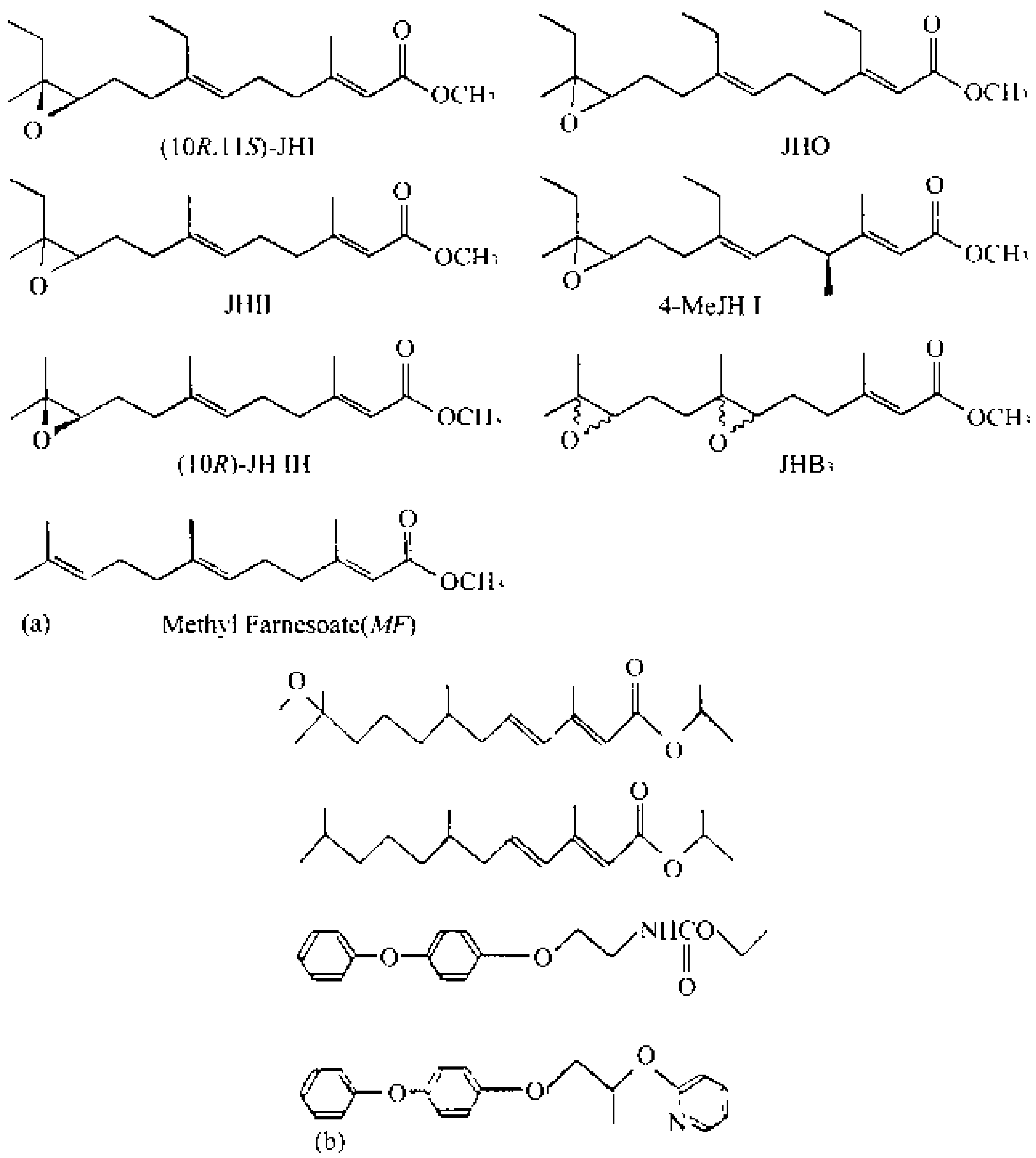



图 14-1 保幼激素及其类似物的化学结构

(a) 保幼激素 (b) 保幼激素类似物

JHAⅢ和异-JHAⅡ)。这些酸进入雄性附腺后被甲基化(Ho 等 et al, 1995)。烟草天蛾的预蛹也能分泌 JH 酸,在发育的成虫器官芽中被甲基化。

甲基法呢酯(methyl farnesoate, MF)结构与 JH 相似,它是一个无环氧基团的倍半萜类酯(图 14-1),在折翅蠊(*Nauphoeta cinerea*)胚胎中含有较高水平的 MF 以外,同时含有多量 JHⅢ。从胚胎中解剖出来的咽侧体,能离体合成 MF;然而 MF 并不能取代 JHⅢ的作用。MF 或其前体,在甲壳纲中含量很高,超过昆虫体内(Laufer et al, 1987)。

从光学异构体来看,环氧基团的主体配位有(10R)和(10R, 11S)两种。两者活性差异很大,开环以后即丧失活性。JHⅢ与 JHⅠ有相同的(10R)构型。JHⅡ的(10R, 11S)构型并没有完全搞清。

Richard 等(1989)在高等双翅目昆虫幼虫体内的环腺和成虫的咽侧体—心侧体复合体中分离并鉴定了(2E)-6, 7; 10, 11-二环氧法呢酯(即 JHB3)。它是 JHⅢ的二环氧化合物,是该种虫体内主要 JH 产物。通过生理学和生物化学研究表明,JHB3 的天然构

型 2E，6S、7S，10R 在蝗虫雌成虫的咽侧体内合成，同时也释放 JHⅢ10，11-二醇和 JHⅢ（Gadot et al，1989）。

## 1　保幼激素的生物合成

JH 由咽侧体内 1 种充满光面内质网的腺细胞合成，虽有很高的合成速率，但并不贮存在腺体中。一部分内质网与胞膜紧密连接，JH 由此通过质膜进入腺体胞外间隙，然后释入血淋巴，与血淋巴 JH 结合蛋白（hemolymph binding protein hJHBP），或与来自脂肪体的载体蛋白相结合，将 JH 运送到靶细胞。

保幼激素合成的基本步骤是：①以丙酸或乙酸为起点；②经过甲羟戊酸（mevallonic acid）；③形成法呢基焦磷酸酯（farnesylpyrophosphate）；④经过法呢酸（farnesoic aicd）；⑤形成保幼激素。

根据 JH 的碳骨架的生物合成的研究，Roller 和 Dahm（1970）确定了惜古比天蚕蛾咽侧体—心侧体复合体中 JH 的合成起始步骤，其中碳骨架的前体是二碳单位，它们来自葡萄糖、亮氨酸、异亮氨基和苏氨酸以及乙酸盐的直接前体（Brindle et al，1988）。3 个二碳单位以乙酰辅酶 A（CoA）结合形式，通过酶促缩合形成 6 碳中间体 3-羟基-3 甲基-戊二酰-CoA（HMG-CoA）。HMG-CoA 被 HMG-CoA 还原酶还原为甲羟戊酸盐，反应过程中需要 NADPH 作为电子载体。该酶在哺乳动物甾醇类合成中起中心作用。但无明确的证据来说明 HMG-CoA 还原酶在 JH 合成时的调节作用。HMG-CoA 还原酶合成抑制剂 Fluvastatin 抑制飞蝗咽侧体内 JH 生物合成（离体试验），若培养基中加入甲羟戊酸内酯，可完全抑制 JH 的产生（Debernard et al，1994）。JH 生物合成的下一步是甲羟戊酯转化为 3-异戊烯焦磷酸酯（IPP）。IPP 异构化为 3，3'-二甲基丙烯焦磷酸酯（DMAPP）。进一步由 IPP 和 DMAPP 合成为法呢基焦磷酸酯，然后转化为法尼醇。法尼醇通过脱氢酶被氧化为法尼醛，需要有 NAD 参与，然后由另一个脱氢酶进一步氧化为法泥酸，也需要 NAD。生物合成的最后一步是在 1 碳位上形成甲基酯，在碳 10/11 位上环氧化。10，11-环氧化酶（单胺氧化酶）通常连接在细胞色素 P-450 上，以 NADPH 作为辅助因子。JH 生物合成的最后二步可能在鳞翅目昆虫中会发生逆转，即由法尼酸到环氧法呢酸再到 JHⅢ，与其他昆虫一样（由法呢酸→甲基法呢酯→JHⅢ）（图 14-2）。

在生物合成中没有明确哪个酶触步骤起限制作用，有证据认为限制步骤可能超过一个以上，但主要发生在甲羟戊酸形成之前。

JH0、JHⅠ和 JHⅢ的起源不同，如丙烯基-CoA、高异戊二烯丙烯基-CoA（由异亮氨酸或缬氨酸产生）和 2 个乙酰-CoA 综合形成长链，其结果合成高甲羟戊酸中间体，这样 JH0 含有 3 个高甲羟戊酸酯单位。JHⅠ由二个高甲羟戊酸酯和一个甲羟戊酸酯单位组成，JHⅡ由一个高甲羟戊酸酯与二个甲羟戊酸酯单位组成（图 14-1）。

果蝇的 JHB3 看来由法呢酸环氧化形成，在 6，7 和 10，11 位上产生 6，7 和 10，11-二环氧法呢酸（FABE），以后在 FABE 末端发生甲基化。在埃及伊蚊的雄性附腺中，与〔$^{14}C$〕乙酸酯温浴，合成放射性标记的 JHⅢ、JHB3 和甲基法尼酯，说明伊蚊雄性附腺具有生物合成能力，并且在卵巢中也能见到〔$^{3}H$〕，〔$^{14}C$〕JHⅢ和 JHⅢ类似物二环氧化分子，它们来自 L-$^{3}H$-甲基甲硫氨酸和$^{14}C$-乙酸盐（Borovsky et al.，1994）。

JH中甲基酯的形成由Tobe和Dratt（1974）进行了详细的研究。将烟草天蛾雄蛹长期温浴在Grace培养液中，发现甲硫氨酸的S-甲基部分参与了JH的甲基酯的形成，甲硫氨酸成为体外合成的原料。以后用3-甲基同位素标记的甲硫氨酸进行了生物合成试验，这一假设得到了证实。

## 2 保幼激素的生物代谢

当JH释放到血淋巴中，受载体蛋白的保护和运送，同时并受酯酶的代谢调节（表14-1）。

**表14-1 保幼激素从合成到靶细胞的调控因子**

（仿东原和成，1995）

| 内分泌途径 | 部位 | 调控因子 | 调控方向 |
| --- | --- | --- | --- |
| 生物合成 | 咽侧体 | 脑神经肽 | |
| | | （咽侧体静息肽） | 负 |
| | | （咽侧体激活肽） | 正 |
| 输送 | 血淋巴 | 血淋巴结合蛋白 | |
| | | （hJHBP） | 正 |
| | | 血淋巴代谢酶 | |
| | | （JHE） | 负 |
| 靶细胞 | 脂肪体 | 细胞内代谢酶 | |
| | 皮细胞 | JHE-JHEH | 负 |
| | 卵巢等 | 细胞质中结合蛋白 | |
| | | JHBP | 正 |
| 基因调控 | 核 | JH受体 | 正 |
| | 细胞表面的第二信使 | JHR受体 | |

### 2.1 JH结合蛋白

甾醇或萜烯类等疏水性激素，在血淋巴中依靠载体蛋白送到靶细胞。疏水性很高的JH能和亲和性很高的血淋巴结合蛋白（hJHBP）结合，对JH具有输送和保护作用，hJHBP中有一类属高分子的分子量$200\times10^3$u以上，以JHⅢ为结合对象，在昆虫血淋巴中较为常见。另一类属低分子的分子量（30～35）$\times10^3$u以上，这些hJHBP具有光亲和标记而容易鉴别，主要在鳞翅目昆虫血淋巴中。随生物化学和分子生物的进步，鳞翅目昆虫的hJHBP已经得到提纯，确定了N-端氨基酸的序列。

烟草天蛾和烟芽夜蛾的hJHBP的全基因序列尚未完全测定，部分片断中就发现53%的相同性。作为JH的载体，与机能相同的哺乳类蛋白质相比，它的保守性较低。另外，抗体反应的交叉性也较低；在昆虫中，因种类之间亲缘关系相差很大，在今后研究昆虫进化时，从hJHBP的结构与序列中可以得到很多进化有关的信息。

hJHBP在血淋巴中的机能是：①运送JH到靶细胞；②保护JH不被酶分解；③防止非特异性吸附（Tromell，1992）。从咽侧体分泌的JH可以与hJHBP充分结合。hJHBP在血淋巴中浓度高达2～12μmol，而JH的浓度只有2～12nmol，它与hJHBP的亲和力Kd=

1～10nmol。因此，JH在血淋巴中都以结合状态存在。血淋巴中JH由被动运输通过靶细胞的膜。JH-hJHBP复合体和胆甾醇—受体复合体一样，在细胞表面如何被受体识别？是今后值得深入研究的问题。

### 2.2 受体与代谢

hJHBP将JH运到靶细胞，如甾醇类激素相似，通过胞膜到核内受到受体基因的调控（Riddiford，1994）。在脂肪体和皮细胞等诱导JH反应的细胞质或核内，有亲和性高的蛋白质。了解受体结构，对于了解作用机能及其调控是十分必要的。以烟草天蛾幼虫表皮为例，JH光亲和性标记可以揭示JH结合蛋白的性质，它的蛋白基因已经得到克隆，它的mRNA和蛋白质出现的模式与核内结合蛋白的模式有微妙的差别。

另外，多数成虫JH作用于细胞膜水平上，使蛋白激酶（PKC）活化，尤其是$Na^+/K^+$-ATP酶被活化，最后出现细胞体积的变化。在黄猩猩果蝇的性附腺中，JH也使PKC活化（Yamamoto et al.，1988）。PKC的活性和G-蛋白共同型受体都受G-蛋白和磷酸化酶C的介导。但分子水平上由于细胞表面JH受体的研究比较困难，因此发展较晚。近年来光亲和性标记的使用，已发现在飞蝗的卵细胞膜上存在受体。根据一些特异标记的蛋白质，JH的作用水平目前发现至少有核内与细胞表面2种，同时也反映出JH作用过程中信息系统是很复杂的。

靶标细胞对JH的识别与JH和hJHBP结合有关。血淋巴中的JH与hJHBP形成复合体，在靶细胞上有识别这种复合体的特别受体。hJHBP的抗体阻碍JH的作用，其作用机制有待进一步研究。

### 2.3 代谢途径

JH在血淋巴及细胞内的浓度，在生物合成与代谢的2个水平上调节，JH的有无对甾醇类激素的作用有很大的影响，在昆虫各生长阶段，JH浓度受到严格的调控。JH的代谢途径主要是由JH酯酶（JHE）与JH环氧水化酶（JHEH）进行调节的，代谢结果生成无活性的JH-酸或JH-二醇（图14-2）。

保幼激素滴度受合成和降解的平衡调节，降解作用使JH滴度在合成没有全部停止时保持低水平。例如在二点蟋蟀末龄幼虫后期，咽侧体活性下降时，在血淋巴中有很高的JH酯酶活性（Hoffmann et al，1995）。另外，代谢还与酯类的水解、环氧化物的羟基化，以及氧化和轭合有关。血淋巴中基本的降解路线是酯酶的水解，但在组织中还存在其他降解路线。

Hanzlik等（1989）揭示了烟芽夜蛾（*H. virescens*）幼虫编码JH酯酶的cDNA片段，据Schelling和Jones（1995）报道，粉纹夜蛾中JH酯酶基因编码一个2.8kb的转录本，它的丰盛度受JH的诱导。

血淋巴中酯酶的代谢活性（离体情况下）常常超过JH的合成，至少在一些昆虫中它对JH滴度调节起到反相调节作用。一般情况下血淋巴中酯酶活性很高，能使JH水平得到下降，然而在很多昆虫中，在发育与生殖时其降解有一定的时间特异性。

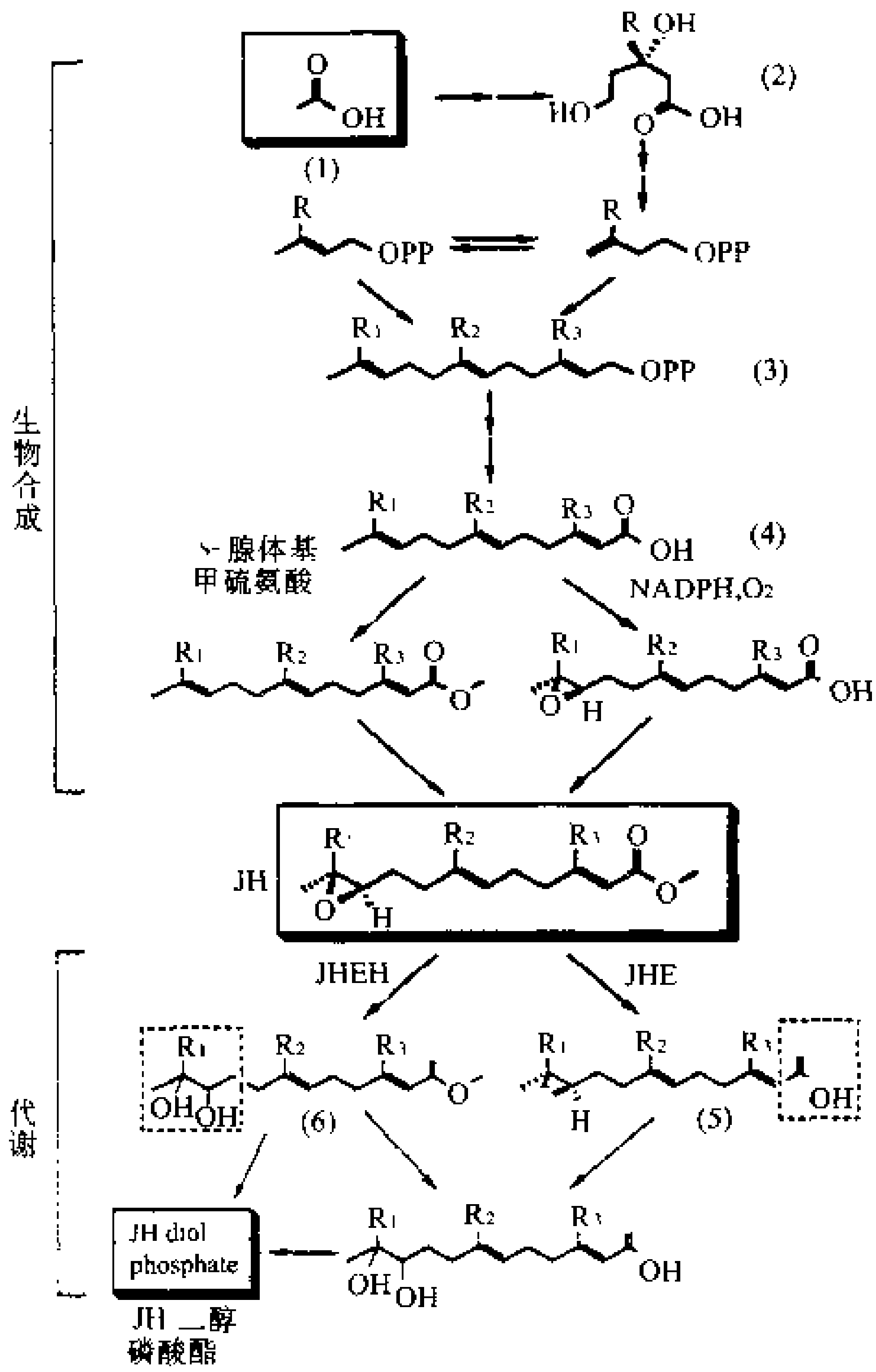



图 14-2 JH的合成与代谢途径（括号内数字示合成步骤）
（东原和成根据 Schooley 与 Hammock，1995）

## 2.4 保幼激素结合蛋白的保护作用

在血淋巴中，JH结合到JH-结合蛋白（JHBP）上，对JH在血淋巴中维持其滴度和分布是决定性的。在飞蝗中结合的和游离的JH比例是2000∶1。在血淋巴中几乎所有的JHⅢ都与JHBP结合，这种结合对保持JHⅢ不受血淋巴酯酶的降解是很重要的。在鳞翅目昆虫血淋巴中也鉴定出了高分子量高亲和力的JHBP（King et al，1992）。在太平洋折翅蠊雌成虫第1个生殖周期中，JHBP与血淋巴总蛋白浓度并不是一致的。外源性JHBP不影响咽侧体在离体时合成与释放JH，血淋巴JH酯酶活性也不受外源性JHBP的抑制。脂蛋白可专一性抑制JH酯酶活性，但并不直接抑制酶。JH在马得拉蜚蠊中因JHBP结合而不受酯酶的降解，这是由于酶的直接保护以及基质的竞争造成的。在太平洋折翅蠊中，在卵黄原蛋白发生时脂蛋白随细胞发育而减退，JH结合蛋白也会随之减少，这与脂类进入卵巢有关。

Debernard 和 Couilland 及其同事们（1994）研究了雌性蝗虫中$^3$H 标记的 10R-JHⅢ的代谢。在离体试验中 JHⅢ酸二醇和一种未知化合物成为 JHⅢ降解的主要产品，在摘除咽侧体 1d 后，当标记的 JH 注射到昆体内时，$^3$H 标记的 JH 很快消失，JH 的代谢速率也大大下降。

### 2.5 保幼激素酯酶

末龄幼虫期，由蜕皮甾醇决定幼虫体壁向蛹的体壁转化，JH 的完全缺乏是必要条件，这时，JH 的生物合成停止，血淋巴中 JHE 的浓度上升，血淋巴及组织中残存的少量 JH 被分解。非特异性酯酶分解游离的 JH；但与 hJHBP 结合的 JH 不被分解。JHE 对 JH 的特异性高，专门分解 hJHBP 结合的 JH（Hammock，1985）。1981 年 Coudron 等分离到烟芽夜蛾的 JHE，以后，以烟芽夜蛾为研究中心，确认了 JHE 的重要性。通过克隆烟芽夜蛾的 JHE 基因，解析了氨基酸序列，一般酯酶具有丝氨酸酯酶特有的丝氨酸、组氨酸、天门冬酰氨等催化三分体（catalytic triad），在 JHE 中是丝氨酸、精氨酸、谷氨酸，亦属丝氨酸羟基酯酶，由此进一步搞清了酶反应机制。

末龄幼虫期一些因子阻碍 JHE 的活性，如有机磷阻害剂或过渡状态类似物（transition state analoy）阻碍幼虫 JHE 的活性，使它在幼虫体内不能完全分解，造成幼虫不化蛹而继续取食；相反在不存 JHE 时，给幼虫投予 JHE，幼虫蜕皮后 12～14h，JH 作用消失而进入表皮黑化临界期。在幼虫蜕皮 30h 前后，血淋巴中通常还存在 JH，若摘去咽侧体，蜕皮后表皮就迅速积累黑色素而黑化。在此临界期注射 JHE，蜕皮后幼虫发生黑化的效果非常明显。表明 JH 在黑化临界期被 JHE 分解，可见 JHE 的适时出现，对幼虫的正常发育成蛹至关重要。

血淋巴中 JH 是与 hJHBP 结合而存在的，JHE 能识别 JH-hJHBP 复合体，JH 从复合体中游离出来溶入血淋巴中，再由 JHE 消除 JH。

### 2.6 JH 环氧水化酶

JH 酯基以外的官能团是环氧基团。它是 JH 环氧水化酶（JHEH）的靶标，代谢产物是没有生物活性的 JH 二醇。JHEH 与 JHE 不同，不存在于血淋巴中，主要分布在细胞内，JHEH 有膜结合型与胞质内可溶型两种，酶活性低于 JHE，在昆虫体内的重要性因昆虫种不同而异。至今唯一定性和提纯的是烟草天蛾卵中 $50\times10^3$u 的膜结合型 JHEH，这种膜蛋白是用 JH 的光亲和性标记鉴定的，对 JH 有很高的基质特异性，对 JH-酸亲和力很低，在 hJHBP 存在时，JH-酸作为基质参与早期代谢。对于 JHEH，JHBP 对 JH 同样有保护作用，而 JH-酸不与 JHBP 结合，JHEH 使之成为 JH-酸二醇。在细胞内 JHEH 也能分解与 JHBP 结合的 JH。JH 的代谢产物以 JH-酸与 JH-酸二醇为主，这一代谢途径通过加水分解使环氧化基团开环。JHE 使水分解产生的 JH-酸丧失活性，转变为 JH-酸二醇时需要有 JHEH 的参与。

## 第二节 保幼激素的作用模式

### 1 对生长发育与变态的调节

保幼激素（Javenile hormone）这一名称的来历就是它能阻断若虫发生变态，不使其成

为成虫，或不使蛹变成成虫。作为一种生长激素，JH控制生命环节中若干位点，在生长变换途径中起开关作用。在这种调变生长的开关控制中，很多作者指出，昆虫组织采取对不同浓度的JH产生应答的方式来完成复杂的调控作用。通过对蜕皮和变态调控的研究，发现在全变态昆虫中变态是在JH滴度连续下降时发生的，在幼虫期会有高浓度的JH，化蛹时JH降到中等或低等水平，成虫没有JH，然而JH可能用浓度依赖方式作用于不连续发育的临界期。变态昆虫只在JH敏感时期，基因表达发生改变。通常在临界期存在JH就关闭向下步发育的开关，继续保持原来发育状态，如果在临界期不存在JH，基因表达发生变化，昆虫进入新的发育途径。在JH敏感期，JH的真正滴度是在阈值上下波动。在半变态昆虫的变态中，幼虫每个龄期都存在JH敏感期，当时JH滴度常常在阈值以上。在末龄幼虫期，咽侧体合成JH关闭，JH降至敏感期阈值以下，从而开启幼虫到成虫的转换开关（Hoffmann et al.，1995）。

在全变态昆虫的末龄幼虫期，敏感期缺乏保幼激素，结果使蛹的特征得到发育。在蛹期，JH的缺乏时就激发成虫发育。JH的主峰是在化蛹之前，与JH敏感期出现相一致。当蛹向成虫转化时，成虫器官芽的开关受到控制。这样，在末龄幼虫期内有两个连续的JH敏感期：第1个JH敏感期，变态时不需要JH，打开皮细胞的幼虫—蛹发育的开关；第2个JH敏感期存在JH，当时成虫器官芽朝着蛹的方向发育，但阻止向成虫发育。进入蛹—成虫发育期，JH又进入缺乏期，这时神经系统发生变化，成虫表皮开始沉积，脂肪体重建，翅肌发育，体壁肌衰退，最重要的是获得生殖能力，所有这些变化原本都受JH的阻断，这时随着JH阻碍作用的消除而完成变态（Kumaran，1990）。

JH对体壁细胞的影响是自主的，独立于其他相邻的细胞。如果将JH点滴到表皮的骨化区域，只阻止下方的细胞不能完成变态，其他则不受影响。过去根据这原理用大蜡螟进行JH生物测定。

JH控制变态的分子机制中，与甾醇激素有相似之处，即通过基因组之间的相互作用，诱导基因特异性转录。JH阻止鳞翅目幼虫某些蛋白基因的转录。JH对细胞活性的调变机制必然通过JH受体，也就是昆虫JH结合蛋白（Wyatt et al，1992）。烟草天蛾幼虫皮细胞核内JH结合蛋白已被克隆和测序，它作为一个可能的受体，并不属于已知的核内受体超级家族，目前只作为功能上的推测。另一些核内结合蛋白（Mr，$31\times10^3$u），已经从血黑蝗（*Melanoplus sanguinipes*）雄虫生殖组织中分离得到，利用光亲和性的JH类似物，可进一步鉴定出JH结合蛋白和JH受体。Engelmann（1995）从另一些靶标组织中分离到JH受体。在马得拉蜚蠊成虫脂肪体中JH受体首先出现在末龄若虫体内，这是一种高亲和性JH结合蛋白，分子量$64\times10^3$u，通过它诱导卵黄原蛋白的合成。昆虫体内JH的效应不仅依赖于血淋巴和组织中JH的存在与浓度变化，而且也依赖于组织对激素的敏感性。当新的JH受体合成以后，组织的敏感性会发生变化，这种不同细胞中对JH的应答类型是在胚胎中决定的。

## 2　对生殖和级型的调节

JH对生殖腺的效应最早是由Wigglesworth（1936）在吸血蝽中观察到，他的实验表明了咽侧体在变态之前的功能。JH产生在雌性成虫中，刺激卵的成熟，在雄性中促进附腺的发育。相反，JH在变态前阻止变态有关的基因的表达。以后的研究表明，在雌虫体

内，JH在不同水平上影响卵的产生，调节卵黄原蛋白的发生，并将其摄入生长中的卵母细胞内；在雄虫体内调节精子发生和无核精子的产生，在个体发育时虽然不出现形态变化，但影响到性腺的基本功能。卵黄发生于脂肪体中，但在果蝇和其他高等双翅目昆虫中，卵巢的滤泡细胞使JH直接作用于Vg基因，进行特异性转录。Engelmann发现，JH在靶标细胞质与核内与特异性受体结合，随后，这些激素受体复合体被Vg基因上的特异性DNA序列所识别，从而启动转录。

JH对脂肪体中卵黄原蛋白合成的影响并不是万能的，它不影响部分鳞翅目和蜜蜂的卵黄合成。在黄猩猩果蝇中和其他双翅目中卵的产生或多或少是连续的，在这些种内，蜕皮甾醇对Vg合成起更重要的调控作用（Hagedorn，1976）。二点蟋蟀的JH不完全调控Vg的产生，只影响Vg的合成量，去咽侧体的雌虫仍然能产一定数量的卵。JH的类似物如hydroprene methoprene和fenoxycarb能使去咽侧体雌虫恢复Vg的合成和卵的产生（Hoffmann et al.，1996）。

所有昆虫通过卵巢的滤泡细胞摄入Vg，在卵母细胞内沉积Vn。在美洲蜚蠊中，去咽侧体后摄入Vg受到抑制，而施用JH能恢复Vg的摄取。在吸血蝽中JH对滤泡细胞的基本功能是在质膜水平上发挥作用的，并受$Na^+/K^+$-ATP酶系统和蛋白激酶C的介导（Seval and Davey，1993）。使用JH以后，滤泡细胞立即产生反应，胞间出现空隙，说明Vg的摄入存在受体的调变作用。

受JH影响的第3种器官是雄性生殖附腺（MARG）。MARG上存在膜受体，JH在膜水平上起作用。飞蝗的MARG与吸血蝽中卵巢滤泡情况相似，在胞内存在JH结合蛋白（Wyatt et al.，1994）。在附腺内JH还受JH酯酶的代谢调控（Braun and Wgatt，1995）。

JH的其他效应是对社会性昆虫（如蜜蜂、胡蜂和白蚁）级的化分和群体的形态分化定向。JH对社会性昆虫级的决定通过不同的发育途径完成，同时也存在神经激素和蜕皮甾醇之间的相互作用。JH诱导蜂王的发育，它是一种“蜂王形成”剂。在蜜蜂中外源性激素首先刺激咽侧体中JH的合成，随后高水平的JH滴度的加强，前胸腺中产生蜕皮甾醇。在预蛹早期增加蜕皮甾醇的滴度，可能直接作用于DNA而调节基因转录，使其朝蜂王途径发育（Rachinshy and Engels，1995）。

多型现象不但存在于社会性昆虫中，而且也存在于其他昆虫中。例如蝗虫、蚜虫和鳞翅目昆虫，多型性与季节变化相联系，或受环境因子的影响。蝗虫，黏虫和地老虎存在单生和聚生的差异。单生的蝗虫体色是绿的，而聚生的是黄色的，巢卵小而翅型大，单生蝗蝻比聚生的以较高的JH滴度影响型的变化。飞蝗体壁在JH诱导下绿色消失，但绿色不是单生的唯一特征，JH调控绿色也并不意味控制多型性的其他特征。JH对蚜虫的作用是决定孤雌生殖型和卵巢发育（Hardie，1995）。

在昆虫的生活史中，存在发育的时序性，例如滞育现象，不同昆虫出现在不同的发育阶段。幼虫滞育常常产生于短光照下，诱导体内的高水平JH滴度，阻止了变态的发生；成虫滞育也发生在短光照下，咽侧体活性受抑制，JH滴度下降使性腺发育停止。

## 3　对胚胎的作用

正如以上讨论的，JH的作用一般发生在胚胎发育的最后时期，由于新形成的咽侧体

的分泌作用，对1龄幼虫表皮的产生和肠道的正常发育都很重要。其他组织的器官发生是否受此影响，还不十分清楚。蝗虫的JH在早期由具有JH-结合蛋白的浆膜产生，但它在当时有何作用并没有测定过（Hoffmann, et, al, 1987）。

在家蟋蟀（*Achaet domesticus*）和烟草天蛾的胚胎发育刚开始时，JH酯酶活性很高（然后下降到低水平），这就使卵解除了母体JH的影响，而能进行正常发育。在雌成虫的卵子发生期，（或新产的卵），用高剂量的JH或JH类似物（JHA）处理就能阻止胚胎的正常发育。雌虫经过处理后，当胚带开始发育时，胚胎发生在胚盘期后迅速受阻。无膜翅红蝽（*Pyrrhocoris apterus*）在卵成熟之前（卵壳形成期），JH对雌虫卵黄原蛋白发生最为有效，但作用的方式还属未知。相反，刚产的卵用JH处理，很多虫种会导致胚胎的背向闭合和胚动方面的缺损。红蝽胚的失调是由于浆膜中某些细胞顶端微丝带没有形成完全。微丝带对于推动胚动有重要作用。同样，器官发生的各个方面会受到破坏（如红蝽神经索的缩短）。JH引起这些不正常发育的作用机制仍不清楚。在处理过的吸血蝽的卵中发现有特异蛋白的分化，但与胚胎发育有何关系也不清楚。

## 4 对细胞定型的调节

JH在幼虫期的重要作用是阻止变态的发生。这种作用在每次蜕皮时都存在。JH必须在蜕皮激素刚开始上升时出现，才能保持细胞的幼虫特征。在后期即使有JH，也不再出现幼虫变态的蜕皮。在幼虫的末龄期，当JH水平很低或没有时，细胞发生变态。这些变化并不是在所有组织中同时发生的，也不同时发生在每个组织的所有细胞中，所以在变态的关键时期，如果有外源JH存在，就会导致出现兼具幼虫和成虫特征的虫体。鳞翅目昆虫的成虫器官芽首先发育，然后形成新的表皮，接着幼虫组织在变态时凋亡。皮细胞的变化和色素沉积随虫体的位置和体节内发生的时间而异。同样，内脏器官如肠、肌肉、丝腺和神经系统都按特定的模式发生。

这些定型变化的发生经常是（但并非总是）在JH不存在时出现的，它与蜕皮激素滴度的微小波动有关。大多数研究还未证实蜕皮激素对这些变化的作用实质。烟草天蛾腹部表皮的溶离表明，低水平20-羟基蜕皮酮对其发生蛹的定型变化是必须的，同样，在离体的腹部注入蜕皮激素也显示出激素对天蛾肌肉和神经系统的定型变化是必须的。

Kremen（1989）经过一系列细致研究认为，蛱蝶（*Preis coenia*）皮细胞的定型变化开始于每个体节的某些集中点，并需要有细胞间联系。当这些定型变化发生的时候，在最后蜕皮的这时段内，存在的蜕皮激素的滴度的微小变化，因此，很多作者假设JH降低通过胞间联系导致蛹的定型，但这种说法与细胞的自主性发生的假设存在矛盾。外源激素会延迟或中止这种进程，甚至阻止这些变化。由于外源蜕皮激素能引起昆虫提早蜕皮，但对蛹定型的时间模式没有影响，这些作者认为JH降低就足以引起定型变化，对于这个假设的关键性试验是测定幼虫皮细胞在离开激素时，它能否发生变态定型以及形成蛹的表皮，但这些工作还没有进行下去。

从幼虫的单个组织来看，JH调节龄期特异性基因在幼虫期和变态时表达。幼虫期JH的存在使蜕皮激素抑制蜕皮期间基因的表达，但并不使它们长期受到抑制，当蜕皮激素消失时，这些基因又能得到表达。蜕皮或变态时，蜕皮激素在JH不存在时发生作用，原有

的幼虫特异性基因被彻底抑制。这时，新的幼虫和成虫的特异性基因得到表达。JH 不存在时低浓度蜕皮激素即能发生作用。

皮细胞形成表皮，并发生色素沉积。这种变化决定于蛋白质的沉积及其与几丁质的相互作用。在蜕皮期或蜕皮间期，不同结构的表皮需要有不同的蛋白质。如惜古比天蚕那样，龄期特异性表皮是在保留旧的和产生新的特异蛋白之间镶嵌形成的。

### 4.1 烟草天蛾幼虫表皮基因表达的调节

烟草天蛾的表皮一直是研究 JH 变态发生的细胞和分子基础的最好材料，这种表皮在离体与活体条件下，对激素的调控作用均有反应。有 JH 时，用 20-羟基蜕皮酮处理皮细胞，在蜕皮激素影响消失后形成新的幼虫表皮；没有 JH 时，则形成蛹型的定向变化，然后形成蛹的表皮。目前，已有几种幼虫表皮基因被分离出来，并进行了它们的激素调控的研究。这些研究使人们对 JH 作用的细胞基础有更深的了解，Riddiford（1994）作了以下的简要总结。

#### 4.1.1 LCP14

LCP14 基因编码一种 $14\times10^3$u 表皮蛋白，都在每个幼虫期表达，但蜕皮时除外。皮细胞在没有 JH 时，对低水平蜕皮激素发生反应，在取食的最后变成蛹的时候，LCP14mRNA 消失，在变态期或变态后不再出现。LCP14mRNA 出现在 4 龄幼虫的皮细胞中，在离体条件下，若用 20-羟基蜕皮酮处理则很快消失。如果用 20-羟基蜕皮酮处理时细胞内已经有 JH 存在，则 20-羟基蜕皮酮消失一段时间后，LCP14mRNA 会再次出现。20-羟基蜕皮酮的这种抑制作用需要有蛋白质的合成，可能是一种蜕皮激素诱导转录因子。

在蜕皮间期表达的幼虫特异基因的最终命运决定于 JH 是否存在。20-羟基蜕皮酮抑制这种基因的表达。JH 存在时，这种基因能在蜕皮激素诱导的抑制蛋白消失之后，再一次表达。没有 JH 时，基因被蜕皮激素持久性抑制。目前，还不知道 JH 是否作用于基因本身，或者调节 ECR 或蜕皮激素诱导的转录因子的产生，或者是修饰染色体的结构。

#### 4.1.2 LCP14.6

LCP14.6 基因编码 $14.6\times10^3$u 幼虫表皮蛋白，该基因有不同的发育表达模式（Riddiford et al，1986）。mRNA 在幼虫体内有两个表达高峰，分别在蜕皮前和蜕皮间期。在蛹定型后，表达限定在体节间膜上，正好在化蛹前和成虫蜕皮前发生。位点分析显示 mRNA 存在于所有幼虫皮细胞中（毛源细胞除外），但是在预蛹期仅存在于形成节间膜的表皮细胞内。预成虫期，在节间着生肌肉位点周围细胞内 mRNA 最多。这样，在 JH 不存在时，细胞对蜕皮激素作出反应，从而发生变态，这个基因的表达受空间和时间的局部调节。

和 LCP14 相似，LCP14.6 基因不离体条件下，在幼虫蜕皮期和蛹定型期被 20-羟基蜕皮酮抑制。但又与 LCP14 不同，LCP14.6 在 5 龄幼虫皮细胞中的表达在蜕皮激素消失后还受到 JH 类似物烯虫酯（methoprent）的抑制。不知道这种抑制是否依赖于 JH 诱导蛋白的合成。当 JH 水平低时，LCP14.6mRNA 活性水平最高，但 JH 对它的蜕皮间期的调控

作用尚不清楚。

### 4.1.3 LCP16/17

烟草天蛾在末龄（5龄）幼虫取食的最后1d，皮细胞合成一系列新的表皮蛋白，它们与降低表皮片层空间和增加表皮柔性部位的硬度有关。至少有3种新蛋白（16、16.3和$17\times10^3$u）是由LCP16/17的多基因家族编码的。

LCP16/17基因有一个短暂的表达模式，就像它的mRNA只在末龄幼虫取食的最后1d才表达一样。表达的开始依赖于蜕皮激素2d内一个小峰。这种表达受到外源性JH的阻止。20-羟基蜕皮酮对mRNA的诱导随蛋白合成的抑制而被阻止，说明其中需要1种新的蜕皮激素诱导的转录因子。JH是否阻止这个因子的出现，改变蜕皮激素诱导的染色体结构，激活原来不表达的基因或直接抑制这些基因，这些都还不清楚。

## 4.2 高等双翅目幼虫和蛹表皮基因表达的调控

在高等双翅目中，3龄幼虫表皮转变成较硬的围蛹用来保护正在发育的蛹。当腹部皮细胞形成蛹的表皮时，幼虫头部和胸部的皮细胞死亡。在果蝇中，1龄和2龄幼虫用尿素提取的表皮蛋白是一样的，但3龄幼虫（末龄）会产生一系列新蛋白，以及两种主要蛋白，它们出现在其他蛋白之前（Kimbrell，et al，1989）。估计这两种新蛋白是在化蛹期蜕皮激素高峰时与各种硬化剂连接在一起的。有趣的是麻蝇（*Sarcophaga bullata*）倒数第2龄和末龄幼虫表皮的水溶性蛋白是相同的，只是某些蛋白质发生了变化（Wilis，1991）

激素对表皮蛋白合成变化的控制作用还不清楚、果蝇的这种变化与JH滴度降低和JH在3龄时代谢上升有关。但是连续用含有JH类似物的饲料饲养果蝇对化蛹几乎没有影响（Riddiford and Ashburner，1998）。

## 4.3 对蛹和成虫表皮基因的调控

根据大蜡螟（*Galleria mellonella*）中胸背板可翻译的mRNA的研究，揭示了1种由JH调节的表达模式。就在蜕皮形成蛹后，蛹表皮蛋白的mRNA就立即出现，然后在1d内消失，这种消失正好与外源性JH敏感性的消失相一致。外源JH能推迟但不能阻止蛹mRNA的消失（Wolbert and Schafer，1991）。

在JH敏感的关键时期，除表皮蛋白变化外，细胞质和细胞核蛋白质的合成模式也发生变化。但JH对这些变化的影响微乎其微。至少有1种细胞质或细胞核蛋白可能与成虫在特定时间的定型分化有关。它在JH存在时不出现。还不清楚这些蛋白质的功能是什么。人们希望了解成虫定型期电泳的差异，由于激素受体和转录因子只是细胞蛋白的一部分，所以要有特异探针才能检测出来。

后来的蜕皮激素上升和新表皮的产生是相一致的。新mRNA出现后，以一种特定的顺序消失，可能随之形成表皮一定的类型。多音大蚕蛾（*Antheraea polyphemus*）和黄粉甲（*Tenebrio molitor*）在蛹形成后，成虫开始发育之前，用JH处理，观察不到这些新的mRNA。在黄粉甲中有1种新的mRNA编码成虫特异性表皮蛋白，由于第2蛹表皮在这些条件下形成，它的mRNA和那些形成蛹表皮的细胞中发现的mRNA是相似（Bouhin et

al, 1992)。

### 4.4 幼虫色素沉积的调节

很多昆虫的色素沉积受JH控制，通常与环境信号（如种群密度）有关。蜕皮时的蜕皮激素高峰期正是对JH敏感的关键时期，但晚于蜕皮类型的决定期。JH作用的细胞和分子基础在烟草天蛾中了解得最为清楚。

#### 4.4.1 昆虫花青苷

烟草天蛾的皮细胞和血淋巴中有一种蓝色的胆素蛋白——昆虫花青苷（insecticyanin）。幼虫皮细胞在蜕皮间期合成、贮藏并分泌两种主要的昆虫花青苷：INS—a（pI5.5）和INS—b（pI5.7）。它们由不同的基因编码。在血淋巴中只有INS—b（Riddiford, 1992）。

在蜕皮间期，昆虫花青苷mRNA在表皮中含量最高，随后由于20-羟基蜕皮酮的作用而在蜕皮时就同LCP14一样消失了。在末龄幼虫取食的最后1d，INS—a的合成停止，INS—b则继续到漫游期。离体条件下用20-羟基蜕皮酮处理5龄1d幼虫皮细胞两次（如同正常活体中），引起INS—a mRNA的不同程度的消失。这两个基因激发了区域的不同，是由于JH不存在时对蜕皮激素敏感性不同引起的（Wolfgang and Riddiford, 1986）。

幼虫蜕皮时，JH不仅决定昆虫花青苷mRNA的出现，而且决定在5龄幼虫皮细胞中的积累。JH数量影响的关键期是在临近蜕皮激素高峰时（头壳蜕出的时候）。这时，如JH不存在，昆虫花青苷在5龄皮细胞中的积累较少，JH恢复到正常水平。最初的一些研究表明，昆虫花青苷的降低是因为幼虫体内在该临界期缺乏JH。

#### 4.4.2 表皮暗化

烟草天蛾幼虫在正常时除了腹部背板的黑色以外表皮是透明的。在蜕皮期间JH不存在时，头壳蜕出后新表皮的暗化（melanization）就发生在虫体蜕皮前。黑色素是从沉积在内表皮颗粒中的多巴胺形成的。这些内表皮中包含有形成黑色素所必需的特异性原酚氧化酶和其他酶。然后，当蜕皮激素滴度下降，酚氧化酶活化，多巴胺在多巴脱羟酶的作用下变成黑色素。

##### 4.4.2.1 微粒体酚氧化酶

引起表皮暗化的微粒体酚氧化酶（PO）在免疫学上不同于与愈伤和血淋巴的酚氧化酶。当JH存在时，头壳蜕出时，酚氧化酶在蜕皮激素下降6h后在皮细胞内开始合成。稍后酶原和其他蛋白质一起沉积在新形成的皮细胞中，然后酶被活化，在蜕皮前3h出现黑色素。

在接近蜕皮激素高峰时，昆虫的头壳蜕出，用JH处理幼虫能阻止酚氧化酶合成的起始。合成开始后，JH能阻止合成速率的进一步升高。因此，JH就直接或间接抑制了这种特异性的酚氧化酶以及相关的微粒体蛋白质的合成，从而不能对蜕皮激素引起的蜕皮作出反应。这种作用是JH阻止蜕皮激素诱导新基因表达的典型例子。相反，JH对合成速率增加的影响则是新的。鳞翅目幼虫脂肪体中，JH抑制某些贮藏蛋白mRNA的出现，但一旦

出现，对其出现的水平则无影响，进一步证实这一假设需要分离酚氧化酶的基因，以便确定 JH 是否调节它在酶合成开始时的转录和翻译。

### 4.4.2.2 多巴脱羧酶

多巴脱羧酶（DDC）对表皮的暗化和骨化都是必需的。天蛾幼虫表皮暗化的时候，DDC 活性是平时的 2 倍，在蜕皮末了还高达正常水平。便给暗化提供了较多的多巴胺。

烟草天蛾 DDC 和 mRNA 在蜕皮的后期出现，在幼虫蜕皮前 10h 达到高峰，然后就在蛹蜕皮前再次达到高峰。最大的表达是在幼虫表皮暗化时，高达正常的 2 倍，若用 JHI 处理刚蜕去头壳的幼虫，能使其恢复到正常的水平。

在蜕皮时 DDC 基因表达的调节比较复杂。用 4 龄幼虫皮细胞进行的离体研究表明，20-羟基蜕皮酮对后来 DDC mRNA 转录的诱导是必需的，而它们出现又抑制这种表达。所以，只有当蜕皮激素滴度下降时才有 DDC mRNA 出现。根据 20-羟基蜕皮酮作用的二重性，可以看出激素诱导着两个具有不同半衰期的转录因子。A 因子具有一个较长的半衰期，对 DDC mRNA 合成起诱导作用，但 B 因子阻止 DDC mRNA 的表达。当蜕皮激素滴度下降时，B 因子由于其半衰期较短而首先消失，直到 A 因子也消失，DDC mRNA 才停止表达。JH 可能通过影响 A 因子的转录或翻译来对 DDC 产生数量效应。

试验证明 20-羟基蜕皮酮对 DDC 的抑制是因为存在一种短命的蜕皮激素诱导蛋白质。在头蜕壳时接近蜕皮激素滴度高峰的时候没有 DDC mRNA。这时用一种蛋白质合抑制剂放线菌酮（cycloheximide），不论在活体或离体条件下，处理 4h 后，观察到高水平的 DDC mRNA。头壳脱出时不是 DDC 表达的高峰期，皮细胞核的提取物包含一个与 DDC 基因 5’-激发子单个区域结合的因子。前者的提取物包括了蜕皮激素诱导的负向调节因子（B)。从两个时期提取的 5’-激发子结合的其他片段中，发现其中可能不止一个结合位点，或不止一个蜕皮激素诱导的正向调节因子，它们对 DDC 基因的活化才是必需的。当我们对这些因子有更多的了解时，可能就会更好地认识 JH 对 DDC 基因的表达水平的影响。

## 5 对器官芽的作用

鳞翅目和双翅目幼虫期成虫器官芽只进行细胞增生而不形成表皮。这种细胞增生是连续的，并没有蜕皮周期。移植果蝇器官芽，细胞增生只发生在用蛋白质饲养的雌性成虫中，而不发生在饥饿的雌虫或雄虫中。在这种情形下，激素是否促进芽的增生尚不清楚。雌性的蜕皮激素水平比雄性高，饥饿两天后这种高水平也不发生变化，而 JH 的水平在饥饿两天之后是相似的。继续饥饿之后，蜕皮激素或 JH 在血淋巴中的水平怎样？激素水平是否保持正常还未进一步研究，延长作用时间可能是很重要的，因为饥饿的天蛾幼虫血淋巴中出现第一个 JH 滴度高峰后，接着在 3～4d 内会很快的下降。

在离体条件下很难发生细胞增生，如果基质中包含烯虫酯（methoprene）和胰岛素，在整个器官芽中都会发生增生。在末龄幼虫或蛹的器官芽中，胰岛素似乎能提高蜕皮激素对外翻的作用，但抑制蛹的分化。

变态时，器官芽开始分化出成虫的触角、复眼、足、翅和外生殖器的各种前体。鳞翅

目昆虫器官芽的末龄幼虫—蛹定型分化要比表皮的分化早很多。用JH处理鳞翅目末龄幼虫能引起额外的翅芽。相反，用JH处理早期或晚期果蝇幼虫则没有类似的影响，尽管离体条件下高浓度JH能阻止蛹对20-羟基蜕皮酮的反应。事实上，只有所饲幼虫的食料含高浓度的持效性JHA（如pyriproxyfen）才能阻止成虫的发育，虽然器官芽外翻，并能形成蛹的表皮，但成虫器官芽的分化受到了抑制；反之，用同样浓度处理2龄中期幼虫则对成虫器官芽的分化无影响，这时器官已开始发生变态。因此，这种影响并非因为JHA对成虫分化开始时有持效性，从而影响到器官芽在1龄中晚期的细胞增生，真正的原因是虫体这时处于第2次蜕皮期中，蜕皮激素上升的时候。在细胞增生早期，高浓度JH对开始变态的影响甚微，但减低了成虫对蜕皮激素作出反应的能力。

在化蛹与刚化蛹后头部外翻间期，用JH处理果蝇和麻蝇（*Sarcophaga bullata*）的腹部组织，会影响细胞向成虫分化。这一时期成组织细胞增生，然后在腹部开始扩展，为成虫表皮作准备。只有在细胞增生期间，JH处理才是最有效的。外源性JH对麻蝇和果蝇成组织细胞的增生均无影响，但有时能阻止幼虫细胞的退化和成组织细胞的扩展和分化。

这样，JH可能允许幼体内器官芽的细胞增生，但是过量的JH在细胞增生的某个时间会对后来成虫分化产生较深的影响。JH的作用是否像变态那样依赖于蜕皮激素，或者简单抑制后来在成虫蜕皮时对蜕皮激素作出反应，从而出现一些细胞变化，这是一个需要进一步研究的重要问题（Riddiford，1994）。

## 6 对脂肪体的作用

脂肪体保持血淋巴的营养平衡，合成各种血淋巴蛋白质，如成虫期的卵黄原蛋白。在幼虫取食期，大多数摄入的营养用来生长，然后在半变态和全变态昆虫的末龄期，脂肪体合成并分泌大量的贮存蛋白（如六聚蛋白）。在全变态昆虫中，这些蛋白质贮存在蛹的脂肪体中，形成晶体状颗粒，以后用于蛹向成虫转化过程。

关于激素对血淋巴蛋白质的调节的研究刚刚开始，这里讨论JH的调节作用。

### 6.1 芳香蛋白

芳香蛋白（arylphorins）是一类含芳香族残基（酪氨酸和苯丙氨酸）的贮存蛋白，用来形成各个时期的新表皮以及成虫的各种组织（如飞行肌）。高等双翅目的芳香蛋白只能在末龄幼虫的脂肪体以及成虫残余的脂肪体内合成，尚未有JH抑制低龄幼虫表达的研究。

鳞翅目昆虫芳香蛋白mRNA的出现以及这种蛋白质的合成是在幼虫的取食期，而不在蜕皮期。就如幼虫表皮蛋白LCP14和LCP14.6的mRNA，高滴度蜕皮激素在蜕皮时引起芳香蛋白mRNA的消失。在每次幼虫蜕皮后再现mRNA和恢复蛋白合成，这与营养的摄入有很大关系。估计蛋白合成的恢复依赖于JH的存在，芳香蛋白mRNA出现在变态早期，消失在蛹蜕皮以后。但不同种类也不尽一致。

家蚕具有一种$30\times10^3$u幼虫特异性血淋巴蛋白，它的mRNA具有与芳香蛋白mRNA相似的表达模式，蜕皮间期表达量高，蜕皮时受抑制。mRNA的表达在末龄早期下降，

这时出现 JH 抑制的其他 $30\times10^3$u 蛋白。是否由于 JH 在末龄幼虫时消失而引起这种蛋白的基因表达下降，这方面尚未见有报道（Fujiwara and Yamashita，1991）。

## 6.2 富甲硫氨酸蛋白

富甲硫氨酸蛋白最初发现在鳞翅目中，家蚕的倒数第 2 龄幼虫的雌雄都在低水平的合成富甲硫氨酸的蛋白。在末龄时只有雌性合成，而且水平较高。这种现象说明了细胞自发的性别特异性。以外源性 JH 类似物烯虫酯处理倒数第 2 龄早期幼虫能阻止这种性别特异性蛋白，但在末龄幼虫的蜕皮期则不行。同样在末龄幼虫蜕皮之前，烯虫酯能抑制贮存蛋白在雌、雄虫体内的合成，而在末龄时促进雄虫体内的合成，对雌虫无影响。这样，末龄幼虫的激素环境与性别特异因子相互作用，引发了脂肪体进入到为变态作准备。

天蛾雌性幼虫富甲硫氨酸蛋白及其 mRNA 直到末龄的第 2 天才出现，雄性体内的合成在漫游期开始，JH 下降对这种出现是必需的。两种不同蛋白质转录的起始在烯虫酯处理后受到抑制，然后随 JH 下降，贮存蛋白 A 又一次出现，而贮存蛋白 B 则不再出现，对于这种有趣的现象没有更详尽的研究报告。

## 6.3 其他受 JH 抑制的贮存蛋白

在各种鳞翅目昆虫（如家蚕、粉纹夜蛾和大蜡螟）和马铃薯甲虫中，一些贮存蛋白出现在末龄幼虫取食中期。家蚕的这些 $30\times10^3$u 蛋白质由几个相似的但又独立表达的基因编码。

这些蛋白的 mRNA 正常出现在 JH 滴度下降时，在幼虫蜕皮或刚蜕皮进入末龄的时候，用 JH 处理能阻止（粉纹夜蛾、大蜡螟和马铃薯甲虫）或延迟（家蚕）蜕皮。活体和离体的试验表明，JH 这种抑制效果直接作用于脂肪体。而在大蜡螟体内，这些mRNA一旦出现，不再受 JH 的抑制，进一步的转录只受蜕皮激素的抑制。天蛾体内所有 JH 抑制蛋白和富甲硫氨酸蛋白与表皮蛋白 LCP16/17 相似，它们的出现表明了变态的来临。蜕皮激素在 JH 滴度下降后对激活这些脂肪体内的基因是否必需，目前还不清楚。

## 6.4 JH 诱导的幼虫贮存蛋白

在摇蚊（*Chironomus thummi*）体内有很多血红蛋白的电泳谱带，至少由 5 个基因编码。中期幼虫的血淋巴中含有血红蛋白可以改善在低氧环境中的呼吸能力。它们在蜕皮间期由脂肪体合成，而不蜕皮或变态时停止合成。用 20-羟基蜕皮酮在离体条件下处理脂肪体，显示出这种激素抑制了其他血红蛋白的合成。尚不清楚这种抑制是否像芳香蛋白，在特异性 RNA 的转录水平上抑制。

各种蛋白合成模式的变化是对一般模式的超级强化。有趣的是有两种血红蛋白通常直到末龄的第 4d 才出现。活体和离体条件下，这两种蛋白在末龄幼虫期的合成均由 JH 诱导，并且伴有可转录的 mRNA 的上升。离体条件下的诱导比活体的弱，这种诱导只发生在末龄初幼虫的体壁、肌肉和脂肪体中，而倒数第 2 龄和末龄中期幼虫的体壁则不发生这种诱导。不能肯定这种差别是真正的发育变化或是培养体系中某些假象。由于这两种血红

蛋白通常在末龄中期才出现，JH 激活它们的转录看来有些自相矛盾。

### 6.5 半变态昆虫幼虫的血淋巴蛋白

德国蜚蠊（*Blattella germanica*）和飞蝗体内也有血淋巴六聚蛋白，它和蜕皮一样具有循环节律。还不清楚这些蛋白是否在合成或吸收水平上受控制。豆蟮（*Riptortus clavatus*）的六聚体血氰蛋白的两个亚单位是在蜕皮间期合成的，每个亚单位都有自己的合成模式。这些循环模式也与芳香蛋白相似，所以它们的激素调控也可能是相似的。

在变态时期可以看到这些芳香蛋白在半变态昆虫中调控方面的差异。这时半变态昆虫体内的合成不会长期停止，但合成的方式会发生变化。例如，飞蝗幼虫特异性贮存蛋白（LSP1）和长期贮存蛋白（PSP）在最后 3 龄的比例是相同的。在末龄晚期 LSP1 比 PSP 多，显然由于这两个基因对 JH 缺少时敏感性会有差异。用 JHA（pyriproxyfen）处理时能抑制 LSP 的上升，但对 PSP 几无影响，PSP 在成虫期仍保持高水平，这时它的合成受 JH 刺激而继续进行。豆蟮的血氰蛋白的两个亚基均在雌、雄的若虫期合成，在成虫期，雌性合成一种，雄性一种也不合成，JH 不存在时发生变态蜕皮，不再抑制这些基因，并改变了它们的调节方式。

## 7 对肌肉的作用

变态时期幼虫的肌肉凋亡或者重建，在成虫期形成新的功能。例如，鳞翅目幼虫某些腹部节间肌肉一直保留到成虫发育时，并在羽化时被利用，然后衰亡。成虫特异性肌肉（如飞行肌）出现在变态时，也受 JH 的控制，但细胞水平和分子水平的作用机制如何，还不清楚。

鳞翅目幼虫的腹足具幼虫特异性。烟草天蛾腹足端部趾沟的皮细胞在末龄幼虫早期蜕皮激素下降后开始衰退，进入漫游期表现出细胞死亡的迹象，主要的腹足收缩肌在预蛹期退化。这种退化依赖于预蛹时的蜕皮激素高峰，但死亡的开始依赖于 JH 不存在时的漫游前期，当时蜕皮激素开始释放。腹足皮细胞的情况也是如此。外源性 JH 处理分离的腹部，与以后的 20-羟基蜕皮酮同时出现成一个相似的高峰，导致蜕皮时保留腹足和肌肉，而趾钩除外。在蜕皮激素释放的时候，用 JH 处理腹足端部，在活体条件下引起腹足的保留，却不阻止肌肉的退化，说明每个组织对蜕皮激素的反应是独立的。相似的现象也能在腹部外斜肌中看到。这种肌肉通常在成虫发育时死亡，JH 处理只阻止蜕皮激素在漫游高峰之前引起的退化效应。就像皮细胞一样，变态时幼虫肌肉的命运是在 JH 缺乏时由蜕皮激素的小高峰作用决定的。

腹部节间肌肉在刚羽化后死亡，用 JH 处理刚开始向成虫发育的蛹，能阻止这种死亡。JH 作用的关键时期是成虫发育时蜕皮激素开始上升的时候，它阻止成虫表皮蛋白的出现。这时用 JH 点滴处理能阻止幼虫肌肉变态，同时阻止肌肉生长和重新定位，以及在成虫表皮上形成新的着生点，这些结构的变化和运动终板的形成受成虫运动神经元的抑制，肌肉对 JH 敏感的时间晚于表皮细胞。因为肌肉重新定位需要从皮细胞获得信息，还不清楚 JH 的这种影响是直接作用于肌肉，还是通过皮细胞讯号产生的。

半变态昆虫的飞行肌在末龄幼期开始发育，飞蝗肌肉的增长和微气管的形成开始于末

龄后期，并与蜕皮激素在蜕皮前的上升有关。微气管的终端细胞的定型分化在末龄早期受雌成虫移入的咽侧体（含保幼激素）的抑制，在刚蜕皮后用烯虫酯点滴处理亦能抑制。这些处理减少了肌肉和线粒体的产生。JH 对成微气管细胞和线粒体再生的影响也能在蟋蟀（*Teleogryllus oceanicus*）中看到，蜕皮后在组织中出现超额的若虫结构，而不是典型的成虫特征。

## 8 对神经系统的作用

幼虫的神经系统在变态时像肌肉一样必须适应成虫发育的新要求，幼虫的神经元死亡或重新特化。新的成虫特异性神经元从幼虫期由未成熟的器官芽细胞产生。JH 对这些变化的控制最初是与蜕皮激素联系在一起的。

烟草天蛾幼虫的腹足受跗节毛状化学感受器的调节。这种感觉器以单突触与运动神经元连接，支配腹足肌肉的收缩。这些感觉毛和它们的传入神经通常在变态时随腹足退化而消失。在蜕皮激素高峰前，用 JH 点滴处理腹足端部，感觉毛和它们中间的突出部分在化蛹后都得到保留。

正常情况下，腹足伸缩肌运动神经已在蛹发育时退化，在化蛹后，全部收缩神经元的整个系统死亡。成虫发育期间，其他限定于两个体节的跗节神经元萌发新的树突来支配新的腹部扩展肌，漫游前期由于不存在 JH，蜕皮激素高峰时，跗节上缩肌的运动神经元随原神经元的死亡而退化。神经元的退化和死亡以及它们支配的腹足收缩肌的死亡，发生在不同的时间内，依赖于对它们激素的耐受力，说明这些细胞变化是独立发生的。

天蛾蛹的腹部有 3 列陷内，陷内中毛状化学感受器的刺激引起腹部收缩，导致内陷关闭。这种反应受保留下来的幼虫感觉神经元和节间肌肉运动神经元的调节，从幼虫—蛹的转变中，也涉及到树状突扩展后调节新出现的蛹特异性反应。在漫游前期蜕皮激素高峰之前，用 JH 点滴处理刚化蛹的内陷部位，导致幼虫一小块表皮以及与它有关的幼虫树状突的保留。对幼虫毛的刺激引起幼虫反应，而蛹毛则引起蛹的反应。为确定这种改变是否充分，在漫游期把腹部分离出来，并用 20-羟基蜕皮酮点滴处理，能引起蛹的内陷的形成，否则还是幼虫的腹部。在这种条件下，感觉神经元的刺激引起幼虫的运动反应。所以，感觉神经元是蛹的，才能激发蛹的反应。其他中枢神经系统在变态中的变化也是必需有 20-羟基蜕皮酮而不能存在 JH。

幼虫运动神经元新的树突分支的形成，在成虫发育时的特化依赖于蜕皮激素，而受 JH 的抑制。成虫的特异性腹部运动神经元 MN-1 和 MN-3 开始于引起成虫发育的蜕皮激素的上升期。MN-1 在蜕皮激素上升早期可用 JHA 处理来抑制，另一个腹部运动神经元 MN-3 对 JH 的敏感性会持续 2～3d。所以，不同的神经元对水平不同的蜕皮激素产生反应。

## 9 对其他形态发生的作用

为了找到一个简单的系统在分子水平上研究 JH 对形态发生作用，已经有人在离体条件下研究了双翅目唾腺的膨突反应和各种昆虫的细胞株。JH 对果蝇幼虫唾腺中蜕皮激素

诱导的膨突反应没有影响，但在蜕皮激素释放阶段，用JH处理抑制腺体对20-羟基蜕皮酮在蛹期的反应。有报道JH类似物激活摇蚊（*Chironomus tentans*）中龄期唾腺的某些膨突，阻止某些正常的形态变化。

暴露于蜕皮激素中的Kc细胞（来自果蝇胚胎），JHA类似物部分地抑制蜕皮激素诱导的形态学变化和细胞增生，完全抑制乙酰胆碱酯酶的出现。相反，JHA类似物对蜕皮激素诱导蛋白EIP28/29的mRNA无影响，而与JHI有相似的作用。对乙酰胆碱酶诱导的抑制发生在有低水平的JHA类似物时，与JH对20-羟基蜕皮酮的比例无关，说明JH不是作为20-羟基蜕皮酮结合的一种竞争性抑制剂，对*Eip*28/29基因的调节区域不起作用。

Berger等（1992）报道，在果蝇S3细胞内小热激蛋白*Chsp*27激发子存在蜕皮激素的活化作用。在包含蜕皮激素应答因子的5'激发子的236P序列中，有两个拷贝融合到受体基因结构中心时，20-羟基蜕皮酮能激活表达，而JHA类似物抑制活化。只有当细胞预处理2h，再用蜕皮激素的处理时，JH才有这种影响，但抑制化合物（如法呢醇）无这种影响。同样，JHA类似物对*hsp*23基因的正常热激反应无影响。因此，Berger等（1992）得出结论，JH—JHR复合体阻止或修饰EcR与DNA的结合，或干扰后来转录的活化。这些影响与JH对天蛾幼虫在离体条件下由蜕皮激素诱导蛹的定型是平行的，这时预处理和连续JH处理对防止20-羟基蜕皮酮的作用都是必需的。所以，S3细胞是研究JH在分子水平上对形态发生作用的一个很好的模式系统。

## 第三节　保幼激素的作用机理

咽侧体分泌保幼激素后，JH就与血淋巴中JH结合蛋白（JHBP）相结合，与血淋巴中部分主要蛋白（如芳香蛋白）还有较弱的亲和性（Goodman和Chang，1985；Goodman，1990，Kanost等，1990）。这些蛋白能够溶解和运输亲脂性分子，保护它在到达靶标之前不受降解酶降解。用纯化的烟草天蛾JHBP处理离体的幼虫表明，阻止化蛹发生的有效JH浓度无显著差异，说明JHBP对靶组织无重要作用。

通过系统研究表明，JH对细胞中靶标有多种作用模式。在吸血蝽（*Rhodnius prolixus*）（Sevala和Davey，1989）的滤泡细胞中和果蝇（Yananoto等，1988）的雄性附腺中，JH主要作用于胞膜，激发磷脂酰肌醇的代谢途径。在脂肪体、皮细胞、卵巢、附腺和果蝇细胞株系中均存在胞内JH结合体。尽管多数研究者认为JH在特定系统中只有一种作用方式，但很可能通过不同受体对特定细胞产生多种作用。

在激活蜚蠊（*Leucophaea*）成虫和飞蝗脂肪体中卵黄蛋白原合成时，JH作为一种类甾醇激素发挥作用，并通过诱导卵黄原蛋白mRNA转录来激活卵黄原蛋白的产生。在加入JH和出现mRNA之间存在一段较长的滞后期，在第2次诱导中大概有12h。这种现象表明其中存在另外一些因子。飞蝗的蛋白合成需要JH，但JH在调控卵黄原蛋白基因表达时，是作为一种协同调节剂起作用的。

东原和成（1995）将JH的作用机制绘成图14-3。下面讨论其中结合蛋白和受体所起的作用。

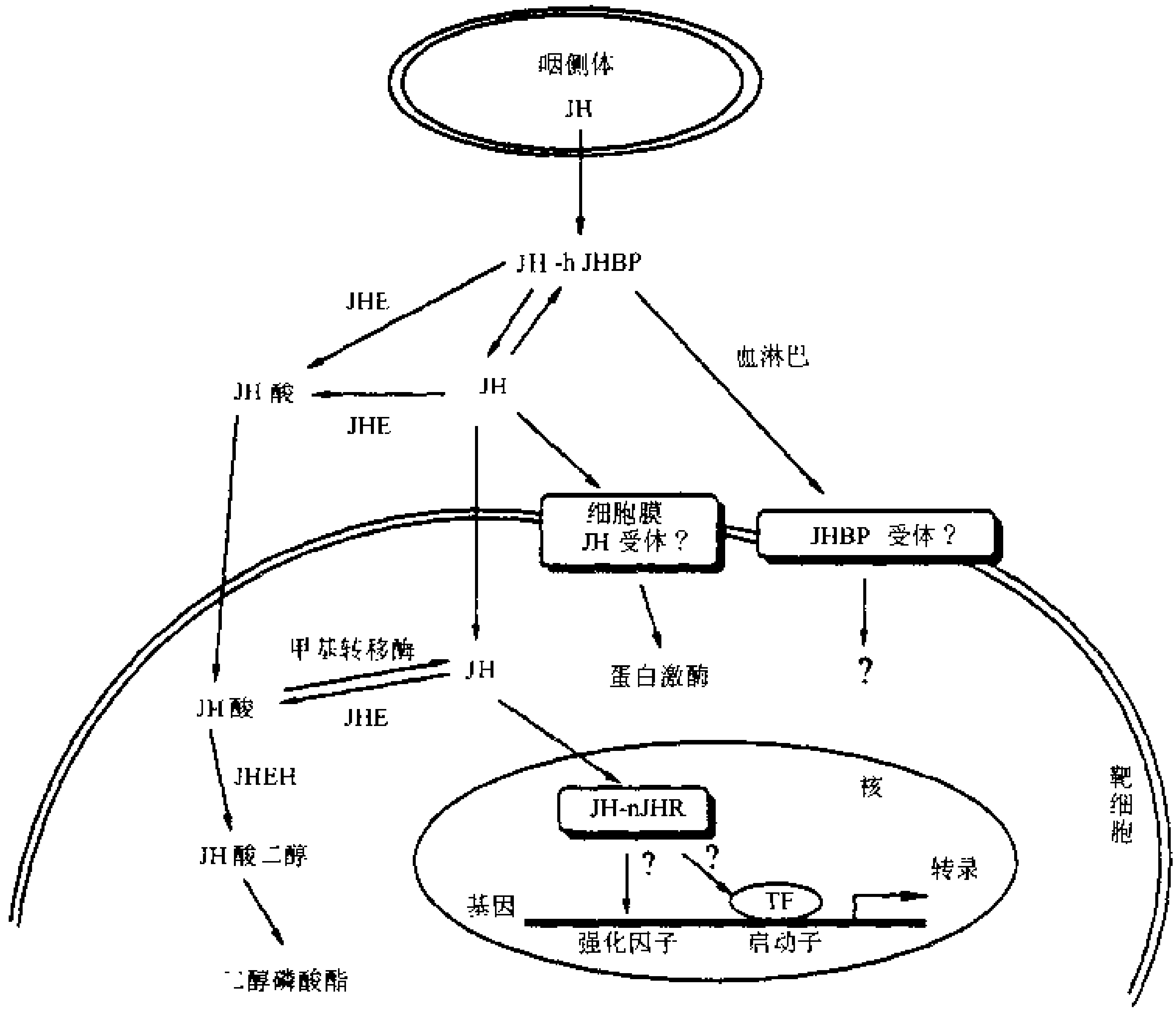



图 14-3 JH 的作用机制和代谢过程

（仿东原和成，1995）

## 1 血淋巴中的 JH 结合蛋白

如前所述 JHBP 有两种（Goodman，1990；Kanos 等，1990）。在利用 JHⅢ的昆虫中，JHBP 具有高分子量（约 $500\times10^3$u）且与 JHⅢ的 10R 天然对映体具有强烈的选择性结合能力。结合部位需要有环氧物和甲基酯。在果蝇的幼虫中，JHBP 分子量也很大（$400\times10^3$u）且以高亲和性与消旋 JHⅢ结合；而 JHⅠ和 JHⅡ与其竞争结合能力较弱（Shemshedini 和 Wilson，1988）。鳞翅目昆虫血淋巴中的 JHBP 分子量较小（20～40）$\times10^3$u，可结合到 JHⅠ和 JHⅡ的天然异构体上；而与 JHⅢ的结合力较弱（Goodman 和 Chang，1985；Goodman，1990）。

从纯化的烟草天蛾的 JHBP 已分离克隆出它的 cDNA。结果证明，JHBP 是由脂肪体产生的且与其他已知蛋白在序列上无相似性（Lerro 和 Prestwieh，1990）。有趣的是，由杆状病毒的 cDNA 所产生的结合蛋白能与 JHⅠ和 JHⅡ相结合（Touhara 等，1992）。Touhara 和 Prestwich（1992）利用 JHⅡ的光亲和类似物环氧法呢基重氮乙酸（EHDA）已经找到了 JH 与这种蛋白的结合部位。他们认为在蛋白分子的 N-和 C-端区存在二硫键、

并形成一个疏水袋，被结合的亲脂性 JH 就嵌在其中。

## 2 胞内保幼激素受体

如果激素作用于细胞，那些细胞中必定有受体去接受激素。这些受体需具以下特性：①因为激素浓度通常较低，所以这些受体必须与激素具有很高的亲和性；②受体能与激素进行特异性结合；③受体与激素结合必须具有饱和性和可逆性；④受体的组织和时间分布要与激素相吻合；⑤激素与受体结合后要能使激素具有生物活性。

对激素受体的生化研究的传统方法是匀浆组织或细胞，再分离亚细胞组分和测定亲和力，并利用放射性标记的激素测定特异性结合体。这种研究方法十分复杂，主要因为有些激素具有亲水性，标记的激素特异性低，而且其受体具有明显异构体和选择性（Braun 等，1992）。然而，通过研究已经鉴定和部分纯化了 JH 受体。对 JH 的具有生物活性的光亲和性类似物进行了标记（Wang 等，1989；Palli 等，1990；Prestwich，1991），使这种类似物以共价光交联到细胞结合蛋白上，经纯化后就可通过放射性标记对蛋白进行追踪。

### 2.1 胞质 JH 结合蛋白

分离出的胞质 JH 结合蛋白大小不一。Wang 等（1989）利用 JHⅢ 的光亲和类似物 10，11-环氧法呢基重氮乙酸（EFDA）从果蝇 Kc 细胞胞质中分离出一种二聚蛋白，其亚单位为 $24.6\times10^3$u。Shemshedini 等（1990）在果蝇脂肪体中发现了一种与 EFDA 特异性结合的 $85\times10^3$u 的胞质蛋白，这些蛋白与 JHⅢ 也具有较高的亲和力。在幼虫体壁和雄性腺中也含有一种具有类似特性的蛋白，但在成虫卵巢或胸部肌肉中无此种蛋白。

在果蝇中若通过外源性激素和延迟生殖来阻止成虫的发生，则果蝇的耐烯虫酯突变体对 JHⅢ 和烯虫酯的敏感性将会下降（Wilson 和 Fabianm1986，1987）。这种抗性是由于脂肪体和雄性附腺中的胞质 JH 结合体的亲和力下降（Shemshedini 等，1990；Shemshedini 和 Wilson，1990）。这种突变体在穿透、排泄和 JHⅢ 的代谢上仅发生了微弱变化，但其胞质 JHⅢ 结合体亲和力却比野生型果蝇低 60%～90%。而且，Met 杂合体有两种结合体，一种具有野生型特性，另一种有 Met 表现型特性。相反，在一种果蝇的 Met 纯合子中仅具有一种 JH 结合体。通过基因和生化分析表明，Met 位点编码胞质 JH 结合体，这对于细胞作用来说十分重要。JH 受体是否能够像蜕皮激素受体那样结合，使 JH 进入胞核，还是阻止这种亲水分子（如细胞视黄酸）与结合蛋白的结合（Blomhlff 等，1990），到目前为止尚不清楚。

在天蛾 5 龄幼虫的皮细胞中已经发现了一种分子量为 $38\times10^3$u 的 JHⅠ 和 JHⅡ 光亲和类似物的结合蛋白，这两种类似物为 10R，IS-环氧二基法呢基重氮乙酸（EBDA）和 10R，IS-环氧基法呢基重氮乙酸（EHDA），也发现了烯虫酯的类似物 7S-烯虫酯重氮乙酸（MDK）（Palli，等 1990）。天然 JH 或烯虫酯可与这些类似物发生竞争性结合，结果表明，这种结合蛋白可能是亲脂性 JH 和 JHA 的一般载体，但还未进一步证明，结合它的亲和力也尚不清楚。胞质中另一种分子量为 $29\times10^3$u 的蛋白也能与上述类似物结合，它的电泳特性与结合特性与下面所讨论的分子量为 $29\times10^3$u 的核内 JH 结合蛋白很相似，说明这两种蛋白可能是同种蛋白。至于这种蛋白是存在于胞质中还是核分离过程中的一种假像尚不

清楚。

## 2.2 核内受体

在许多组织中已经发现了具有较高亲和力的核内 JH 结合体，在飞蝗成虫的脂肪体提取物中发现了这种蛋白，它能以极高亲和力与纯 JHⅢ特异性结合（Braun 等，1992）。

### 2.2.1 幼虫皮细胞中核内受体的特性

当 JH 进入 15d 的蛾幼虫的皮细胞时，由于 JHⅠ分别与两种不同亲和力结合体作用，JH 的 32%保留在核内（Osin 和 Riddiford，1988）。另外还发现了对碘化乙酰基烯虫酯具有相似亲和力的两种核结合体。每个二倍体核上大约有 10 000 个亲和位点与 JH 结合。而且通过研究表明，JH 类似物不能与天然 JH 竞争性结合，反过来也是如此。说明它们可能与不同的分子相结合或与同一分子的不同位点相结合。

在 15d 幼虫的皮细胞和脂肪体中，也发现了与 EBDA 和 EHDA 相结合的蛋白，其中 1 种 pI 为 5.8，分子量为 $29\times10^3$u，另一种 pI 为 6.0 能与 MDK 特异性结合。天然激素能与 EBDA 和 EHDA 竞争性结合而烯虫酯却不能；烯虫酯及其衍生物能与 MDK 竞争性结合，而天然 JH 则不能。Osin 和 Riddiford（1988）通过分离皮细胞核已经发现了这种分子量为 $29\times10^3$u 蛋白，具有相似的结合特性。

通过放射性标记，JHⅡ和烯虫酯的光亲和类似物，可以从天蛾皮细胞中纯化 $29\times10^3$u 的核内蛋白，这种蛋白能与 JHⅡ的类似物 ENDA 特异性结合（Prestwich，1991；Prestwich 等，1992；Palli 等，1993）。通过多聚酶联反应（PCR）可利用从三肽片段中制备的聚核苷酸来获得 190bp 的 DNA 片段（Palli 等，1993）。通过对这种编码 $29\times10^3$u 蛋白的 cDNA 的分离和测序表明，这种蛋白 30%在 C-端都具有 4 个由 8～12 个氨基酸组成的区域，这一区域有 60%～75%相同。在 IRBP 中这种相同处位于 IRBP 的四叠蛋白重复区。IRBP 通常被认为能与脂肪酸结合（Borst 等，1989）。因此，这一区域可能是 JH 结合位点的一部分。假定的 JH 结合位点的 N-端的 21 氨基酸区域与人的 P68 核内蛋白有 43%的相同性。后者是一种 RNA 螺旋酶，这种酶存在于整个虫期的核内（当细胞分裂后就进入核内）（Iggo 和 Lane，1989），但其功能尚不清楚。

含有棒状病毒产生的 $29\times10^3$u 蛋白的细胞提取物能以较高亲和力与 JHⅠ和 JHⅡ相结合（Palli 等，1993）。这一亲和力与分离的表皮胞核对 JHⅠ的亲和力相似（Osin 和 Riddiford，1988），比重组血淋巴中的 JH 结合蛋白的亲和力大（Touhara 等，1992）。由棒状病毒产生的 $29\times10^3$u 蛋白也能与 EHDA 相结合（Palli 等，1993），然而，如果要确定这些结合常数和研究天然激素与各种 JH 类似物的结合位点，就要对 $29\times10^3$u 蛋白进一步纯化。

利用多克隆抗体对 $29\times10^3$u 蛋白进行免疫细胞化学研究表明，这种蛋白存在于 4 龄和 5 龄幼虫的皮细胞和脂肪体的细胞核内（Palli 等，1993）。而且，在核内，仅亚核结构被染色，染色情况与由 Tuck 和 Looke（1985）在天蛾幼虫皮细胞中发现的铋染色核仁情况相似，人们已经从电子微观水平上开始研究在核仁内是否存在已知的抗原。

通过蛋白印迹的 DNA 片段杂交实验已证明，$29\times10^3$u 核内蛋白能和 LCP14 和

LCP16/17 特异性结合，而且与 $29\times10^3$uJH 结合蛋白有相同的发育形式（Palli 等，1990）。然而 $29\times10^3$uJH 结合蛋白的假设序列中还没有已知的 DNA 结合位点（Palli 等，1993），而它的免疫细胞化学核内定位与两种已知的 DNA 结合蛋白（蜕皮甾醇受体和 $MHR_3$）不同，因此搞清它是否与一些幼虫皮细胞基因相互作用以及如何作用仍是一个热点问题。

### 2.2.2 核内 $29\times10^3$uJH 结合蛋白的激素调控

与 MDK 相结合的 $29\times10^3$uJH 结合蛋白，在 4 龄和 5 龄幼虫的表皮中都存在，而在幼虫蜕皮期间其含量就下降，在缺乏 JH 时（仅受 20-羟基蜕皮酮控制的漫游期）就消失了（Palli 等，1991），然后在蛹的腹部皮细胞中重新出现。在幼虫蜕皮期和蜕皮间期由于一直存在 JH，所以这些 $29\times10^3$u 蛋白才能保持正常水平。而且，以后这种蛋白仅仅会出现在有 JH 存在的预蛹期，当时正值蜕皮甾醇高峰期。

通过对编码 $29\times10^3$u 蛋白质的 cDNA 的杂交，证明其具有与 mRNA 表达相似的发育形式。尽管通过免疫印迹检测出这种蛋白的含量，在幼虫最后 1 次蜕皮时很低，RNA 的含量未检测到（Palli 等 1993）。相反，在漫游期和蛹前期的皮细胞中，RNA 和蛋白质都消失，仅在化蛹前才有微量的 mRNA 存在。因此，$29\times10^3$u 核内蛋白只存在于 JH 含量很高时，即幼虫生长期和由蜕皮甾醇起动的幼虫蜕皮期，后一时期中 JH 起阻止变态的作用。在蛹前期虫体内无 JH，仅存在蜕皮激素，这时 $29\times10^3$u 蛋白也随之消失，当蛹期 JH 重新出现时，又会出现这种蛋白。这种蛋白发育形式及其对 JH 的高亲和力和特异性结合表明，它对 JH 的作用至关重要。当然 JH 受体在激素作用中也是十分必要的。

## 2.3 JH 在变态时调控蜕皮甾醇的作用

JH 在变态中并无特异性作用，只是改变了蜕皮甾醇的分子反应。虽然昆虫经常蜕皮，但 JH 的存在就保证了蜕皮时维持原有形式，同样的基因在蜕皮结束后和下次开始前都能表达。当 20-羟基蜕皮酮首次进入细胞时，必须有 JH 存在（Riddiford，1978，Berger 等，1992）。因为蜕皮甾醇在基因组水平上发挥作用，通过许多核内作用证明 JH 是一种蜕皮甾醇作用的调控剂。在天蛾的皮细胞中，进入细胞的 JH 有 1/3 存在于核中，1/3 在微粒体片段中，剩余的在胞质片段中（Osn 和 Riddiford，1988）。这样就可能通过膜和第二信使来发挥变态前的调控作用，可惜在这一领域中还没有做过更多的研究。

JH 如何在分子水平上调控蜕皮甾醇的作用，仍是一个有待解答的问题。它的作用可能是直接的也可能是间接的。它的直接作用是在蜕皮甾醇-受体（Ec-EcR）复合体与 JH-JHR 复合体间竞争受体，从而决定受体与蜕皮激素应答因子结合或在 JH 的其他位点结合，从而干扰转录激活或失活所必需的序列。Bergur 等（1992）已经证明了 JH 能抑制一定的基因，决定 20-羟基蜕皮酮的活化，这种基因结构包含有两个蜕皮激素应答因子和多个短侧支序列。但是 JH 是否与这些序列结合仍属未知。对编码转录因子的早期基因的蜕皮激素应答因子的控制，或对其附近区域的控制看起来不大可能，因为 JH 不能阻止蜕皮甾醇起动和协调蜕皮，也不能阻止蛋白合成的诱导，这种蛋白能够调控基因的连续转录，而这种基因会在幼虫中蜕皮期表达。许多蜕皮甾醇诱导的转录因子，例如，E74

(Thumme 等，1990)、E75（Segraves 和 Hohness，1990；Jindra 等，1992；Segraves 和 Woldin，1990）和 MHR3（Palli 等，1992）参与在蜕皮级联中基因的激活与抑制。因为这些因子出现在幼虫的最后 1 次蜕皮期，因此也不太可能受 JH 影响。然而对于 MHR3 来说，若在体外存在高剂量的 JH Ⅰ 时，将会延迟对 20-羟基蜕皮酮产生反应和启动表达（Palli 等，1991）。这种作用的机理尚不清楚 相反，其他的一些因子如一些受体结合蛋白首次出现在变态期（DiBello 等，1991；Guay 和 Guid，1991；Andres 和 Thummel，1992），所以它们的出现可能直接或间接地由 JH 调控。

JH 也可能直接作用于蜕皮甾醇诱导的级联靶基因。在这种情况下，JH-JHR 复合体结合于幼虫特异性基因部位，可能会阻止 JH 的这种永久性抑制作用。这种结合可通过干扰蜕皮甾醇诱导而改变染色体，染色体的改变对于抑制作用来说是很必要的。同样，JH-JHR 复合体的结合可能会固定基因周围染色体结构，这种基因直到变态发生时才会表达，这样就阻止蜕皮甾醇或蜕皮甾醇诱导的转录因子与基因接合。然而，对染色体结构的影响并不一定要 JH-JHR 复合体直接作用于调控基因。复合体可能仅仅是改变染色体核蛋白的合成或有关活动。

烟草天蛾幼虫的皮细胞中的 JH 受体与 RNA 螺旋酶仅具微弱的相似性。受体位于细胞中核仁有关的亚结构内（Ralli 等，1993）。资料表明，在核内 JH 会影响 RNA 的代谢，其影响包括作用于 mRNA 的转录与翻译，核糖体 RNA 的产生或核糖体的组装。

JH 也可能调控细胞中蜕皮甾醇受体水平，并调控变化着的蜕皮甾醇的动态，从而间接地影响蜕皮甾醇的作用。烟草天蛾幼虫期的运动神经中无蜕皮甾醇受体，只在每次蜕皮前有微量存在（Riddiford 和 Truman，1993）。如果不考虑变态期间这些运动神经元是否重建或死亡，那么在蛹前期它们的蜕皮甾醇受体（EcR）含量都很高。如果向分离出的腹部中注射 20-羟基蜕皮酮，则 EcR 的水平增加，但如果同时存在 JHA，EcR 水平就不会增加。在烟草天蛾中，幼虫皮细胞的蜕皮甾醇受体（以 mRNA 和免疫细胞化学为基础）水平在任何时候都比较低；只在蛹前期也会有 1 次短暂的增长（Riddiford 和 Truman，1993）。

烟草天蛾在变态时其蜕皮甾醇受体的异构体是否也存在性质上的变化，目前还不知道。果蝇只在末龄幼虫中期的运动神经元中才具有蜕皮甾醇受体，这些幼虫通过化蛹获得受体的 $B_1$ 异构体（Trumun 等，1993）。在蛹发育期这种异构体就消失了。两栖动物的变态中也存在类似情况，它们的甲状腺激素能诱导变态，而促乳素能抑制变态（Dent，1988；Tata 等，1991）。正常情况下，在幼虫期存在甲状腺激素受体的异构体，然后在变态高峰时存在的主要是 α 异构体（Yaoita 和 Brown，1990；Kawahara 等，1991）。促乳素能够阻止 β 异构体的出现（Baker 和 Tata，1992）。假设调控新异构体的基因不能被激活或不能表达，那么变态就不能进行。JH 阻止昆虫变态的作用可能也是相似的。

## 第四节 作为昆虫生长调节剂的保幼激素类似物

Williams（1956）在首次报道 JH 的天然提取物时就建议把这种激素作为杀虫剂来使用。因为它可通过昆虫皮细胞被吸收从而阻止正常发育，并且不会产生抗药性。自从“纸因子”（“paper factor”）发现以后，表明它对选择性控制昆虫有一定的潜力，这种“纸因

子”是半翅目红蝽科昆虫体中的一种 JH 的类似物。从而，它们被称为“第三代杀虫剂”(Williams，1967)。JH 类似物已经能人工合成。合成的 JH 类似物生物活性和化学稳定性。在合成的化合物中许多是“昆虫生长调节剂”(IGR)，也有许多已经发现或预计在控制害虫种群中具有应用价值 (Henrick 等，1976；Sehnal，1983；Retnakaran 等 1985；

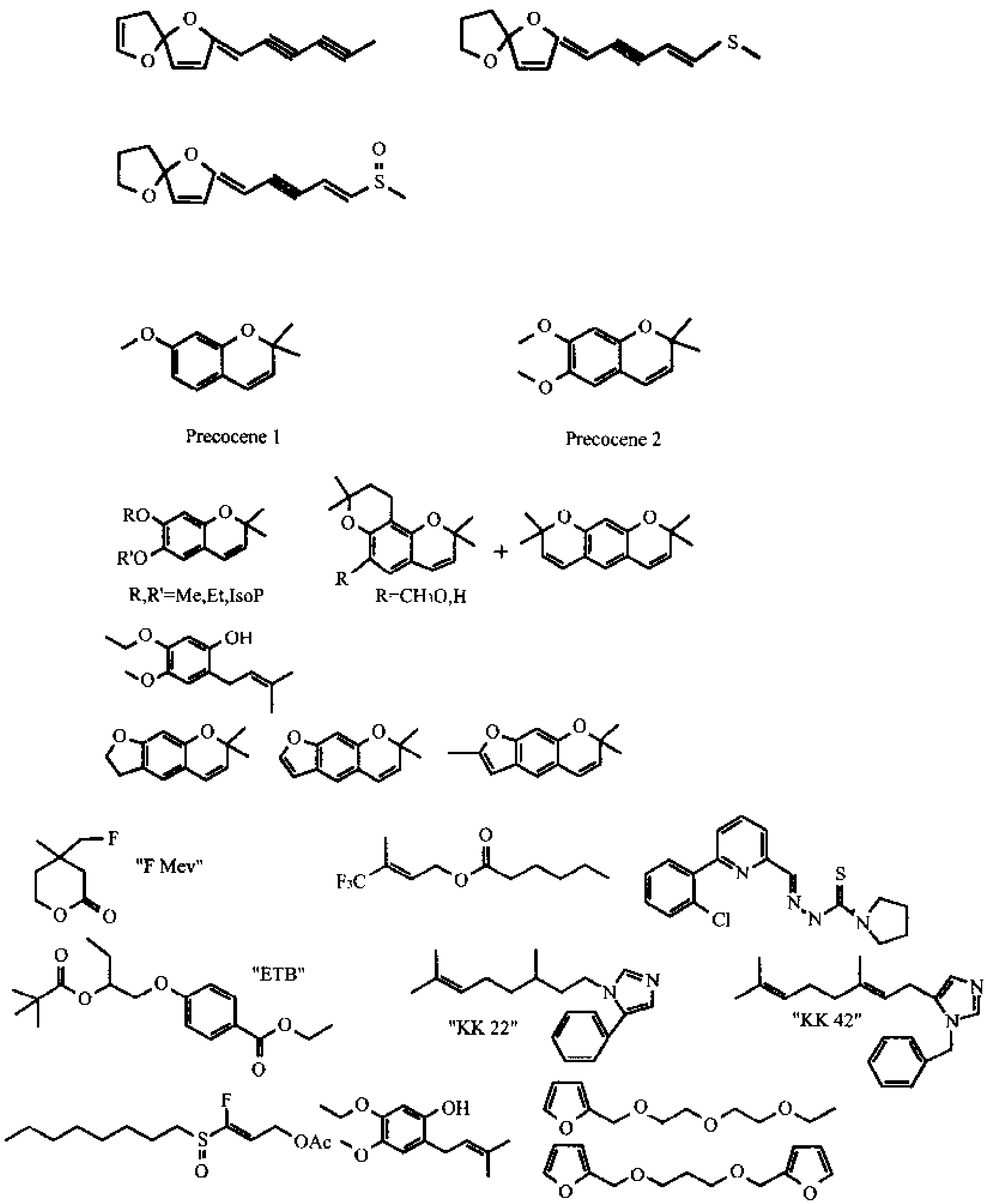



图 14-4　抗保幼激素类似物

Hatakoshi 和 Nakayama，1987；Langley 等，1990)。研究者们将许多 IGR 作为 JH 颉颃剂来应用，避免直接应用的天然 JH 迅速失活。例如，methoprene 和 hydraprene 类的 JHA，在结构上与 JH 很相似，并且可防止生物降解，具有化学稳定性（Henrick 等，1973)，奇怪的是还发现了许多活性物质的化学结构与 JH 不大相同，它们通常具有芳香基团。这些具有活性的 JHA 已报道的包括 fenonycarb（Dorn 等，1991；Masner 等，1981）和 pyriproxyfer（Hata koshi 等，1986，1989），它们都是些芳香族化合物，与 JH 相似性很小。这些物质的性质稳定，在高活性的方面需要具有一个特异性受体结合位点，并具有激活细胞系统的能力。各种 JHA 生物学作用与天然 JH 很相似，但很可能有效剂量和稳定性有所不同，它们具有相同的作用模式，因而可能也具有相同的受体。这些活性类似物结构多种多样。具有生物活性的天然 JH 的空间要求却很严格，而且大多数活性类似物能够在细胞质和细胞核提取物中与天然 JH 竞争结合（Osir 和 Riddiford，1988；Goodman，1990；Braun 等，1992)。

许多化合物由于有干扰保幼激素的功能，因此称为抗保幼激素（图 14-4)，都是具有保幼激素作用或抗保幼激素功能的化合物。已经有不少投入生产和应用，如 KK22，KK42 等。

通过上述种种概说，可以看出 JH 是如何拟合到基因上，仍是一个谜。是 JH-JH 受体复合物直接与活化幼虫结构基因和失活蛹成虫基因共同作用，还是通过蛋白-蛋白复合体与其他转录因子共同作用，仍不清楚。也许 JH 只是简单地影响蜕皮甾醇受体的类型或影响特异性转录因子，如果是这样，那又是如何影响的呢？JH 能否影响 RNA 代谢、转录和翻译，能否影响调节性 RNA？这些问题只有通过实验来解答，而且需要了解 JH 在变态时对基因作用的分子基础。

# 第十五章 昆虫性信息素

性信息素是刺激同种异性行为反应的由腺体分泌的化学物质。昆虫信息素的化学研究起始于20世纪30年代，由于受化学结构测定技术和仪器设备条件的限制，进展缓慢。直到1959年才由Butenandt从家蚕（*Bombyx mori*）鉴定出第一个性信息素成分——蚕蛾醇。其化学鉴定化费了将近50万只雌蛾的提取物。1966年Berger又从2 500头粉纹夜蛾雌虫腹端获得5mg的性信息素天然物。自此之后，超过400种昆虫的性信息素鉴定了出来，仅在鳞翅目昆虫中就分离鉴定出350多种性信息素，其中多数已能人工合成。这些化学物质在防治害虫和行为生理学的研究中发挥了很大的作用。此外，鞘翅目、膜翅目、等翅目和双翅目中的不少种害虫信息素也被鉴定出来。

## 第一节 鳞翅目昆虫的性信息素种类

迄今为止，鳞翅目是昆虫信息素化学研究中最为详尽的一个目。25年来，通过对雌蛾和雄蛾性信息素的化学结构鉴定、结构和生物活性间的关系等研究，对鳞翅目昆虫性信息素的化学有了基本的概略了解。

研究结果表明，大多数雄蛾总是通过雌蛾释放的性信息素定位雌体。但对于蝶类而言，却无远距离的性信息素联系系统存在，它们性别之间的定位通过视觉。当雄蝶接近雌体后，释放一种催欲剂，但这类性信息素在性行为上的作用仍知之甚少。

# 1　雌蛾产生的性信息素

## 1.1　化学结构的基本特性

至今，已被分离和鉴定出化学结构的性信息素的蛾类据统计 170 余种（表 15-1），分属 20 个科。其中以卷叶蛾科、夜蛾科、螟蛾科、灯蛾科研究得较为详尽。通过田间筛选试验发现的性引诱剂，据统计将近 1 000 种，分属 35 个科。

鳞翅目雌蛾释放的性信息素大都属脂族化合物，其化学结构的特征仅表现在碳链长短、双键位置和两端基因的顺反、功能团等方面的差异。

多数鳞翅目昆虫的性信息素是具有 10～21 个碳的脂肪族，碳链最短的是桃枝麦蛾（*Anarsia lineatella*）性信息素，反-5-十碳烯醇醋酸酯和反-5-十碳烯醇，而最长的是黄杉毒蛾（*Orgyia pseudotsugata*）的性信息素，顺-6-二十一碳烯酮-11。其中，碳链长度为十二、十四、十六碳的约占总数的 90%。这些化合物的分子质量在 158u 以上。

双链位置自第 3 位到第 13 位，其中以第 7、第 9、第 11 位最为常见。以双键的构型而论，多数为顺式异构型，但也有不少种类为反式异构体。双键数目多为 1 个，部分种类为 2 个，至今为止，只发现美丽灯蛾、黎豆夜蛾等少数种类性信息素具有 3 个双键。

蛾类信息素功能团最常见的为醋酸酯，其次为醇基，再次为醛基和酮基，少数种类为环氧基和丙酸酯。此外，在灯蛾科中，还有烷类。

**表 15-1　鳞翅目雌虫性信息素的化学结构一览表**

| 昆虫名称 | 化学结构 |
|---|---|
| 邻菜蛾科（Acrolepiidae） | |
| 葱鳞菜蛾（*Acrolepiopsis assectella*） | Z-11-14:Al |
| 透翅蛾科（Aegeriidae） | |
| 桃透翅蛾（*Sanninoidea exitiosa*） | Z，Z-3，13-18:Ac |
| 桃小透翅蛾（*Synanthedon pictipes*） | E，Z-3，13-18:Ac |
| 灯蛾科（Arctiidae） | |
| 橘灯蛾（*Holomelina aurantiaca*） | 2-甲基十七烷 |
| *Holomelina immaculata* | 2-甲基十七烷 |
| *Holomelina lamae* | 2-甲基十七烷 |
| 美国白蛾（*Hyphantria cunea*） | Z，Z，Z-9，12，15-18:Al　Z，Z-9，12-18:Al<br>Z，Z，Z-3，6，9，10-环氧-二十碳双烯（5:6:13） |
| 盐泽灯蛾（*Estigmene acraea*） | Z，Z-9，12-18:Al　Z，Z，Z-9，12，15-18:Al<br>Z，Z-3，6-9，10-环氧-二十一碳二烯（1:6:27） |
| 具带灯蛾（*Isia isaebella*） | 2-甲基十七烷 |
| 美丽灯蛾（*Utetheisa ornatrix*） | Z，Z，Z-3，6，9-二十一碳三烯 |
| 蚕蛾科（Bombycidae） | |
| 家蚕（*Bombyx mori*） | E，Z-10，12-16:OH　E，Z-10，12-16:Al |
| 野蚕（*Bombyx mandarina*） | E，Z-10，12-16:OH |
| 果蛀蛾科（Carposinidae） | |
| 桃小食心虫（*Carposina niponensis*） | Z-7-二十碳烯醇-11　Z-7 和 E-7 十九碳烯醇-11 |
| Cohylidae | |
| *Eupoecilia ambiguella* | Z-9-12:Ac　12:Ac（1:5） |

（续）

| 昆虫名称 | 化学结构 |
| --- | --- |
| 木蠹蛾科（Cossidae） | |
| 蒙古木蠹蛾（*Cossus mongolicua*） | Z-5-12:Ac |
| 芳香木蠹蛾（*Cossus cossus*） | Z-5-12:Ac Z-3-10:Ac (8:2) |
| 麦蛾科（Gelechiidae） | |
| 马铃薯麦蛾（*Phthorimaea operculella*） | E, Z, Z-4, 7, 10-13:Ac E, Z-4, 7-13:Ac (1:1) |
| *P. etoperculella* | E, Z, Z-4, 7, 10-13:Ac |
| 棉红铃虫（*Pectinophora gossypiella*） | Z, E-7, 11-16:Ac Z, Z-7, 11-16:Ac (1:1) |
| 甘薯暖地麦蛾（*Brachmia macroscopa*） | E-11-16:Ac |
| 桃枝麦蛾（*Anarsia lineatilla*） | E-5-10:Ac E-5-10:OH (5:1) |
| *Scrobipalpa ocellatella* | E-3-12:Ac |
| 麦蛾（*Sitotroga cerealella*） | Z, E-7, 11-16:Ac |
| 尺蛾科（Geometridae） | |
| 冬尺蛾（*Operophtera brumata*） | Z, Z, Z, -1, 3, 6, 9-19:Ac |
| 细蛾科（Gracillariidae） | |
| 茶叶细蛾（*Caloptilia theivora*） | E-11-16:Al |
| 枯叶蛾科（Lasiocampidae） | |
| 马尾松毛虫（*Dendrolimus punctatus*） | Z, E-5, 7-12:Ac Z, E-5, 7-12:OH |
| 赤松毛虫（*Dendrolimus spectabilis*） | Z, E-5, 7-12:OH |
| 加州天幕毛虫（*Malacosoma californicus*） | E, Z-5, 7-12:Al |
| 森林天幕毛虫（*Malacosoma disstria*） | E, Z-5, 7-12:Al E, Z-5, 7-12:OH (1:10) |
| 毒蛾科（Lymantriidae） | |
| 舞毒蛾（*Lymantria dispar*） | Z-7, 8-环氧-2-甲基-十八烷 |
| 模毒蛾（*Lymantria monacha*） | Z-7, 8-环氧-2-甲基-十八烷 |
| 花旗松毒蛾（*Orgyia pseudotsugata*） | Z-6-二十一烯-11-酮 Z-1, 6-二十一二烯-11-酮 |
| 夜蛾科（Noctuidae） | |
| 稻螟蛉（*Naranga aenescens*） | Z-9-14:Ac Z-9-16:Ac Z-11-16:Ac (1:1:4) |
| 玉米楷夜蛾（*Busseola fusca*） | Z-11-14:Ac E-11-14:Ac Z-9-14:Ac (10:2:2) |
| 展叶松夜蛾（*Diparopsis castanea*） | E-9, 11-12:Ac 11-12:Ac (16:5) |
| 蛮夜蛾（*Gortyna xanthenes*） | Z-11-16:Al Z-9-16:Al 16:Al (96:2:2) |
| 大螟（*Sesamia inferens*） | Z-11-16:Ac |
| 亚热带粘虫（*Spodoptera eridamia*） | Z-9-14:Ac Z, E-9, 12-14:Ac (4:1) |
| 莎草粘虫（*Spodoptera exempta*） | Z-9-14:Ac Z, E-9, 12-14:Ac |
| 甜菜夜蛾（*Spodoptera exigua*） | Z, E-9, 12-14:Ac Z-9-14:OH<br>Z, Z-9, 12-14:Ac |
| 草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*） | Z-9-12:Ac Z-9-14:Ac (9:1) |
| *Spodoptera littoralis* | Z, E-9, 11-14:Ac Z, E-9, 12-14:Ac (20:1) |
| *Spodoptera litura* | Z, E-9, 11-14:Ac Z, E-9, 12-14:Ac (10:1) |
| 黎豆夜蛾（*Anticarsia gemmatalis*） | Z, Z, Z-3, 6, 9-二十一碳三烯<br>Z, Z, Z-3, 6, 9-二十碳三烯 (5:3) |
| 劳氏粘虫（*Leucania loreyi*） | Z-11-16:Ac Z-11-16:OH (8:1) |
| 甘蓝夜蛾（*Mamestra brassica*） | Z-11-16:Ac Z-11-16:OH |
| 蓓带夜蛾（*Mamestra configurata*） | Z-11-16:Ac Z-9-14:Ac (19:1) |
| 菜园灰夜蛾（*Mamestra oleracea*） | Z-11-16:Ac Z-11-16:OH (1:1) |
| 豌豆灰夜蛾（*Mamestra pisi*） | Z-11-14:Ac Z-9-14:Ac (1:3) |
| 殊异灰夜蛾（*Mamestra suasa*） | Z-11-16:Al |
| 一点粘虫（*Pseudaletia unipuncta*） | Z-11-16:Ac |

（续）

| 昆虫名称 | 化　学　结　构 |
| --- | --- |
| 车轴草切根夜蛾（*Scotogramma trifolii*） | Z-11-16:Ac Z-11-16:OH (9:1) |
| 棉铃虫（*Helicoverpa armigera*） | 16:Al　Z-9-16:Al　Z-11-16:Al |
| 美洲棉铃虫（*Helicoverpa zea*） | 16:Al　Z-9-16:Al　Z-11-16:Al　Z-7-16:Al |
| *Heliothis subflexa* | 16:Al　Z-9-16:Al　Z-11-16:Al<br>Z-7-16:Al　Z-9-16:Ac　Z-11-16:Ac　Z-7-16:Ac |
| 烟芽夜蛾（*Heliothis virescens*） | 16:Al　Z-9-16:Al　Z-11-16:Al<br>Z-7-16:Al14:Al　Z-9-14:Al　Z-11-16:OH |
| 小地老虎（*Agrotis ypsilon*） | Z-7-12:Ac　Z-9-14:Ac (5:1) |
| 黄地老虎（*Agrotis segetum*） | Z-5-10:Ac　Z-7-12:Ac　Z-9-14:Ac |
| 八字地老虎（*Amathes c-nigrum*） | Z-7-14:Ac　Z-5-12:Ac |
| 红背地老虎（*Euxoa ochrogaster*） | Z-5-12:Ac　Z-7-12:Ac　Z-9-12:Ac |
| 枣粘虫（*Ancylis sativa*） | E-9-12:Ac　Z-9-12:Ac (8:2) |
| 警纹地老虎（*Scotia exclamationis*） | Z-5-14:Ac　Z-9-14:Ac |
| *Autographa biloba* | Z-7-12:Ac |
| 苜蓿银纹夜蛾（*Autographa californica*） | Z-7-12:Ac |
| 烟草金翅夜蛾（*Plusia chalicites*） | Z-7-12:Ac　Z-9-14:Ac |
| 大豆夜蛾（*Pseudoplusia includens*） | Z-7-12:Ac |
| *Rachiplusia ou* | Z-7-12:Ac |
| 粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*） | 12:Ac Z-5-12:Ac Z-7-12:Ac 11 12:Ac<br>Z-7-14:Ac Z-9-14:Ac |
| 埃及金刚钻（*Earias insulana*） | E, E-10, 12-16:Al |
| 舟蛾科（Notodontidae） | |
| 松异舟蛾（*Thaumetopoea pityocampa*） | Z-13-hexadecen-11-ynyl acetate |
| 羽蛾科（Pterophondae） | |
| 洋蓟羽蛾（*Platyptilia carduidactyla*） | Z-11-16:Ac |
| 螟蛾科（Pvralidae） | |
| 二化螟（*Chilo suppressalis*） | Z-11-16:Al　Z-13-18:Al (5:1) |
| 甘蔗二点螟（*Chilo infuscatellus*） | Z-11-16:OH |
| 高粱条螟（*Chilo venosatus*） | Z-13-18:Ac　Z-13-18:OH Z-11-16-Ac (4:2.4) |
| 甘蔗条螟（*Chilo sacchariphagus*） | Z-13-18:Al　Z-13-18:Ac (7:1) |
| 玉米茎螟（*Chilo partellus*） | Z-11-16:Al |
| 酸模蔓苞螟（*Chrysoteuchia topiaria*） | Z-11-16:Al |
| *Amyelois transitella* | Z, Z-11, 13-16:Al |
| 地中海粉螟（*Anagastra kuehniella*） | Z, E-9, 12-14:Ac |
| 粉斑螟（*Cadra cautella*） | Z, E-9, 12-14:Ac |
| 烟草粉斑螟（*Ephestia elutella*） | Z, E-9, 12-14:Ac |
| 向日葵斑螟（*Homoeosoma electellum*） | Z, E-9, 12-14:OH　Z-9-14:OH |
| 印度谷斑螟（*Plodia interpunctella*） | Z, E-9, 12-14:Ac |
| 桃蛀螟（*Dichocrocis punctiferalis*） | E-10-16:Ac　Z-10-16:Al (9:1) |
| 菜心野螟（*Hellula undalis*） | E, E-11, 13-16:Al |
| 亚洲玉米螟（*Ostrinia furnacalis*） | Z-12-14:Ac　E-12-14:Ac　14:Ac |
| 欧洲玉米螟（*Ostrinia nubilalis*） | Z-11-14:Ac　E-11-14:Ac |
| 三化螟（*Tryporyza incertulas*） | 16:Al　Z-9-16:Al　Z-11-16:Al |
| 草地螟（*Loxostege sticticalis*） | E-11-14:Ac |
| 稻显纹纵卷水螟（*Susumia exigua*） | Z, Z-7, 11-16:Ac　Z, E-7, 11-16:Ac |

(续)

| 昆虫名称 | 化学结构 |
| --- | --- |
| 天蚕蛾科(Saturniidae) | |
| 多音柞蚕(*Antheraea polyphemus*) | E, Z-6, 11-16:Ac E, Z-6, 11-16:Al (9:1) |
| 透翅蛾科(Sesiidae) | |
| 杨树透翅蛾(*Paranthrene tabaniformis*) | E-3, Z-13-18:OH |
| 天蛾科(Sphingidae) | |
| 烟草天蛾(*Manduca sexta*) | E, Z-10, 12-16:Al |
| 谷蛾科(Tineidae) | |
| 幕衣蛾(*Tineola bisselliela*) | E-2-18:Al E, E-2, 13-18:Al (1:2) |
| 卷叶蛾科(Tortricidae) | |
| 苹异形小卷蛾(*Cryptophlebia leucotreta*) | E-8-12:Al Z-8-12:Al (1:1) |
| 豆荚小卷蛾(*Cydia nigricana*) | E, E-8, 10-12:Al |
| 梨小食心虫(*Grapholitha molesta*) | Z-8-12:Ac E-8-12:Ac E-8-12:OH 12:OH |
| 广翅小卷蛾(*Hedya nubiferana*) | 12:OH Z-8-12:Ac E, E-8, 10-12:Ac |
| 苹果蠹蛾(*Laspeyresia pomonella*) | E-8, E-10-12:Ac |
| 花翅小卷蛾(*Lobesia botrana*) | E, Z-7, 9-12:Ac |
| 葡萄小卷蛾(*Paralobesia viteana*) | Z-9-12:Ac |
| 欧洲松梢小卷蛾(*Rhyacionia buoliana*) | E-9-12:Ac |
| 二二针松小卷蛾(*Rhyacionia frustrana*) | E-9-12:Ac |
| 脂松梢小卷蛾(*Rhyacionia rigidana*) | E, E-8, 10-12:Ac |
| 加勒比松梢小卷蛾(*R. subtropica*) | E-9-12:Ac |
| 苹白小卷蛾(*Spilonota ocellana*) | Z-8-14:Ac |
| *Tetramoera schistaceana* | Z-9-12:Ac |
| 落叶松线小卷蛾(*Zeiraphera diniana*) | E-11-14:Ac |
| 长须卷蛾(*Sparganothis directana*) | E-9, 11-12:Ac E-11-14:Ac Z-11-14:Ac (35:19:28) |
| 黄头长翅卷蛾(*Acleris minuta*) | E-11, 13-14:Al |
| 茶小卷蛾(*Adoxophyes orana*) | Z-9-14:Ac Z-11-14:Ac (9:1) |
| 棉褐带卷蛾(*Adoxophyes fasciata*) | Z-9-14:Ac Z-11-14:Ac (9:1) |
| 西卷蛾(*Amorbia cuneana*) | E, E-10, 12-14:Ac E, Z-10, 12-14:Ac |
| *Archippus breviplicanus* | E-11-14:Ac Z-11-14:Ac (53:23) |
| 果树卷叶蛾(*Archips argyrospilus*) | Z-11-14:Ac E-11-14:Ac 12:Ac |
| 樱桃円巢卷蛾(*A. cerasivoranus*) | Z-11-14:Ac E-11-14:Ac |
| 栎黄卷蛾(*Archips semiferanus*) | Z-11-14:Ac E-11-14:Ac |
| 亚麻黄卷蛾(*Archips podana*) | Z-11-14:Ac E-11-14:Ac (1:1) |
| 蔷薇黄卷蛾(*Archips rosanus*) | Z-11-14:OH Z-11-14:Ac (1:9) |
| 红带卷蛾(*Argyrotaenia velutinana*) | 14:Ac Z-11-14:Ac E-11-14:Ac 11-12:Ac Z-9-12:Ac E-9-12:Ac |
| 甘蔗条小卷蛾(*Argyroploce schistaceyana*) | Z-9-12:Ac |
| 柝小卷蛾(*Argyroploce citrana*) | Z-11-14:Al Z-11-14:Ac (1:100) |
| 枞色卷蛾(*Choristoneura fumiferana*) | Z-11-14:Al E-11-14:Al (4:96) |
| 紫色卷蛾(*Choristoneura murinana*) | Z-9-12:Ac |
| 西枞色卷蛾(*Choristoneura occidentalis*) | Z-11-14:Al E-11-14:Al (8:92) |
| 蔷薇斜条卷蛾(*C. rosaceana*) | Z-11-14:Ac E-11-14:Ac E-11-14:OH |
| 双斜卷蛾(*Clepsis spectrana*) | Z-11-14:Ac Z-9-14:Ac (90:10) |
| 云卷蛾(*Cnephasia pumicana*) | E-9-12:Ac Z-9-12:Ac (1:1) |
| *Epichoristodes acerbella* | Z-9-14:Ac Z-11-14:Ac Z-11-14:OH (8:64:26) |

（续）

| 昆虫名称 | 化学结构 |
|---|---|
| 咖啡黄卷蛾（*Homona coffearia*） | E-9-12:Ac　12:Ac 12:OH (36:49:15) |
| 茶黄卷蛾（*Homona magnanima*） | Z-11-14:Ac　Z-9-12:Ac　11-12:Ac (30:3:1) |
| 木樨卷蛾（*Pandemis heparana*） | Z-11-14:Ac　Z-9-14:Ac　Z-11-14:OH　12:Ac (90:5:5:1) |
| 三线卷蛾（*Pandemis limitana*） | Z-11-14:Ac　Z-9-14:Ac |
| 葡萄褐卷蛾（*Pandemis cerasana*） | Z-11-14:Ac　E-11-14:Ac (64:21) |
| *Pandemis pyrusand* | Z-11-14:Ac　Z-9-14:Ac (94:6) |
| *Platynota ideausalis* | E-11-14:Ac　E-11-14:OH (2:1) |
| *Platynota flavedana* | Z-11-14:OH　E-11-14:OH (84:16) |
| 荷兰石竹小卷蛾（*Platynotastultana*） | Z-11-14:Ac　E-11-14:Ac (94:6) |
| *Sperchia citri* | Z-11-14:Ac　E-11-14:Ac (1:2) |
| 欧洲栎卷蛾（*Croesia semipurpurana*） | E-11-14:Al　Z-11-14:Al (85:15) |
| 张翅卷蛾（*Croesia curcalana*） | E-11-14:Al　Z-11-14:Al　E-11-14:Ac<br>Z-11-14-AC (76.5:13.5:8.5:1.5) |
| 巢蛾科 Yponomeutidae | |
| 油橄榄巢蛾（*Prays oleae*） | Z-7-14:Al |
| 苹果巢蛾（*Yponomeuta padella*） | 16:Ac Z-9-16:Ac　Z-11-16:Ac　14:Ac　E-11-14:Ac　Z-11-14:Ac |
| 小菜蛾（*Plutella xylostella*） | Z-11-16:Al　Z-11-16:Ac (2:3) |

注：E. 反式　Z. 顺式　Ac. 醋酸酯　OH. 醇　Al. 醛　左起数字为双键位置，右边为碳数，例：Z-11-14:Ac. 为顺-11-十四碳烯醇醋酸酯。

### 1.2　化学结构和活性的关系

鳞翅目昆虫性信息素的化学结构比较简单，而特异性很强，稍微改变一下化学结构就会造成引诱活性的大幅度降低，甚至完全失去活性。大量的田间试验表明，昆虫对其性信息素结构中的双键位置、碳链长短和顺反异构体等要求非常严格。

粉纹夜蛾的性信息素主成分是顺-7-十二碳烯醇醋酸酯，碳链长短或双键位置稍经变化，其对雄蛾的诱捕率竟下降 80%～90%；双键位置从第七位移至第九位或第五位时，最低活性浓度相差 3 个数量级以上。舞毒蛾性信息素为顺-7，8-环氧-2-甲基-十八烷，其合成类似物的田间试验表明，环氧基团位置变更，活性成千倍下降；即使甲基侧链位置稍作移动，活性至少下降到原来的 1/20。

近年来，人们还发现许多性信息素的旋光异构体和外消旋化合物能模拟天然性信息素的生物活性。例如欧洲玉米螟和红带卷叶蛾的主要性信息素成分均为顺-11-十四碳烯醇醋酸酯，生测结果表明欧洲玉米螟对其结构类似物（S）-（－）-9-（2-环戊烯基）-壬醇醋酸酯有反应，而对（R）-（＋）对映体却几乎无反应，对外消旋化合物的反应介于上述两者之间。红带卷叶蛾对（S）-（－）和（R）-（＋）对映体的反应相等，而对外消旋化合物的反应比较强。又如舞毒蛾性信息素顺-7，8-环氧-2-甲基-十八烷的（＋）和（－）对映体具不同的生物活性，（＋）对映体具有较高活性，而（－）对映体无活性。

### 1.3　昆虫性信息素的抑制剂

对大量性信息素类似物的筛选研究发现，许多类似物对性信息素引诱活性具抑制作用。这些抑制剂本身无引诱作用，化学结构多半和性信息素相仿。

如果在棉红铃虫性信息素粗提物周围放置顺-7-十六碳烯醇醋酸酯时，粗提物的引诱作用受到抑制。

据报道，鳞翅目中若干种类的雌蛾性信息素腺体中就存在着具抑制作用的组分。推测这些组分可能是性信息素生物合成中的前体。如舞毒蛾性信息素腺体中存在1种顺-7-十八碳烯烃化合物对雄蛾的定向具抑制作用。云杉卷叶蛾腺体中含有对性信息素具强烈抑制作用的反-11-十六碳二烯醇对高斯性信息素有抑制作用。

卷叶蛾科的三带卷叶蛾的性信息素为顺-9-十四碳烯醇醋酸酯和顺-11-十四碳烯醇醋酸酯（6:64），当加入6%的反-11-十四碳烯醇醋酸酯时几乎完全丧失了引诱雄蛾的能力。

## 2 雄性产生的性信息素

有关鳞翅目雄蛾和雄蝶产生的性信息素方面的知识，相当欠缺。其主要原因是以往的研究偏重于颇有应用价值的雌蛾性信息素之故。近年来，随着昆虫交配通讯机理研究的深入，才发现雄性信息素在种间生殖隔离中具重要作用。至今，被鉴定出化学结构的雄性信息素种类虽然尚为数不多，但已显示出它在化学结构和行为功能上的复杂性。

### 2.1 雄蛾的性信息素

从雄蛾味刷中鉴定出的性信息素化学结构几乎全是简单的醛、羧酸和萜类（表15-2）。分子量低，挥发性高。

**表 15-2 鳞翅目雄虫性信息素的化学结构一览表**

| 昆虫名称 | 化学结构 |
|---|---|
| 灯蛾科（Arctidae） | |
| 桑灰灯蛾（*Creatonotus transiens*） | 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| 黑条灰灯蛾（*Creatonotus gangis*） | 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| 褐斑灯蛾（*Utetheisa pulchelloides*） | 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| *Utetheisa lotrix* | 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| 美丽灯蛾（*Utetheisa ornatrix*） | 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| 伊莎贝尔虎蛾（*Phragmatobia isabella*） | 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| 亚麻灯蛾（*Phragmatobia fuliginosa*） | 6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| 顶灯蛾（*Estigmene acrea*） | 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| *Cisseps fulvicollis* | 7-羟基-6，7-二氢-5H-吡咯-1-羧基甲醛 |
| 夜蛾科（Noctuidae） | |
| *Mythimna impura* | 苯甲醛，异丁酸 |
| *Mythimna conigera* | 苯甲醛，异丁酸 |
| *Mythimna pallens* | 苯甲醛，异丁酸 |
| 甘蓝夜蛾（*Mamestra brassicae*） | 2-苯基乙醇，苯甲醇 |
| 白肾灰夜蛾（*Mamestra persicariae*） | 2-苯基乙醇，苯甲醇，苯乙醛 |
| 蓓带夜蛾（*Mamastra configurata*） | 2-苯基乙醇 |
| 灰夜蛾（*Polia nebulosa*） | 2-苯基乙醇，苯甲醇，苯甲醛 |
| *Polia tencta* | 2-苯基乙醇，苯乙醇 |
| 豆杂色夜蛾（*Peridroma saucia*） | 2-苯基乙醇 |
| 一点黏虫（*Pseudaletia unipuncta*） | 苯甲醇，苯甲醛，醋酸 |
| 东方黏虫（*Pseudaletia separata*） | 苯甲醛，苯甲醇，苯甲酸，正丁醇酸 |
| *Phlogophora meticulosa* | 6-甲基-5-庚烯-2-酮，6-甲基-5-庚烯-2-醇，2-甲基丁醇酸 |

（续）

| 昆虫名称 | 化学结构 |
|---|---|
| 秀夜蛾（*Apamea monoglypha*） | 松香芹酮 |
| 冬夜蛾（*Cucullia umbratica*） | 2-甲基丁醇酸 |
| *Agrochola helvola* | 2-苯基乙醇 |
| *Raghuva albipuncta* | 内二酸二乙酯 |
| 黎豆夜蛾（*Anticarsia gemmatalis*） | (Z，Z，Z) -3，6，9-二十一碳三烯 |
| 蝙蝠蛾科（Hepialidae） | |
| *Hepialus hecta* | 6-乙基-2-甲基-3，4-二氢-2H-吡喃 1，8-二甲基-3-乙基-2，9-二噁双环-［3，3，1］壬-7-烯<br>1，8-二甲基-3-乙基-2，9-二噁双环-［3，3，1］壬-7-烯-6-酮 |
| 虎蛾科（Agaristidae） | |
| *Phalaenoides glycinae* | 2-苯基乙醇，2-苯基乙酯乙酸酯 |
| 螟蛾科（Pyralidae） | |
| 烟草粉螟（*Ephestia elutella*） | E-叶绿醇，癸内酯（γ-Decalactone），γ-十一内酯（γ-Undecalactone） |
| 非洲蔗螟（*Eldana saccharina*） | 香兰素，对羟基苯甲醇，(E) -3-甲基1，-4-二甲基烯丙基 γ-内酯 |
| *Paralipsa gularis* | 2-苯基乙醇，n-2，6-壬二烯-4-交酯 |
| 大蜡螟（*Galleria mellonella*） | 正壬醇，正十一醛 |
| 小蜡螟（*Achroia grisella*） | 正十一醛，顺-11-十八碳烯醛 |
| 米蛾（*Corcyra cephalonica*） | (E，E) 法尼醛，(E，Z) －法尼醛 |
| 尺蛾科（Geometridae） | |
| 蔷薇白尺蛾（*Bapta temerata*） | 正丁酸 |
| 卷蛾科（Tortricidae） | |
| 梨小食心虫（*Grapholita molesta*） | (-) 蜜蜂曲菌素，茉莉酸甲酯，2-表茉莉酸甲酯，反式-肉桂酸乙酯 |

螟蛾科中，大蜡螟雄蛾分泌的信息素为正壬醛和正十一醛。一种小蜡螟雄蛾在近距离内释放正十一醛和顺-11-十八碳烯醛。这两个化合物单独存在时无活性，而混合物能激起雌蛾的性行为。

卷叶蛾科的梨小食心虫（*Grapholitha molesta*）由位于尾端的成对白色毛束分泌出4种化合物，其中反式-肉桂酸和2-表茉莉酸甲酯对2cm远的雌蛾具有引诱作用。

灯蛾科中，黑条灯蛾（*Creatonotus gangis*）和桑灰灯蛾（*C. transiens*）的味刷均十分发达，味刷中存在着数量不等的羟基斑蝶酮〔R(－)hydroxydanaidal〕。*Utetheisa*属的3个种：褐斑灯蛾（*Utetheisa pulchella*）、*U. lotrix*和美丽灯蛾（*U. ornatrix*）的生殖瓣上着生有味刷，其中的主要化学物质为羟基斑蝶酮。亚麻灯蛾（*Phragmatobia fuliginosa*）和其近缘种伊莎贝尔虎蛾（*P. isabella*）在腹部第七、八腹板间也具有味刷，这两种蛾味刷中的物质存在差异，前者主要含有斑蝶酮（danaidal），而后者则主要含有羟基斑蝶酮。虽然这两种成分均可起催欲作用，但雌蛾对同种雄蛾释放的物质更为敏感。

夜蛾科中，从冬夜蛾亚科、盗夜蛾亚科、剑纹夜蛾亚科雄蛾味刷中鉴定出2-甲基丙酸、2-甲基丁酸、苯甲酸、6-甲基-5-庚烯酮-2、苯甲醛、松香芹酮、2-苯乙醇等性信息素成分。一种粘虫 *Pseudaletia separata* 雄蛾在交尾时释放1种苯甲醛化合物，以阻止雌蛾逃脱。粉纹夜蛾香刷中的化学成分为2-苯基乙醇。黎豆夜蛾（*Anticarsia gemmatalis*）香刷分泌物主要成分是（Z，Z，Z）-3，6，9-二十一碳三烯，是雌蛾性信息素的主要成分。*Phlogophora meticulosa* 的毛束状分泌腺中包含有至少3种成分，当雄蛾飞近雌蛾时，将毛束展开。在小笼饲养中，展开毛束的雄蛾中有87%的个体成功交配，而30头移去了毛

束的雄蛾却均未交配。

尺蛾科的很多种雄蛾具有香刷或味刷，这些腺体多数存在于雄蛾生殖器旁，随生殖器的外伸而展开，形成掌状结构，释放出正丁酸。

### 2.2 雄蝶的性信息素

鳞翅目蝶类释放的信息素除引诱雌蝶外，尚起诱发雌蝶性行为的作用。

从2种粉蝶味刷中分离和鉴定出2种雄性信息素成分：牻牛儿醛和橙花醛。雄性苜蓿粉蝶（*Colias eurytheme*）和云纹粉蝶（*C. philodice*）的翅腺分泌物截然不同。苜蓿粉蝶的翅腺中分泌的是一个带侧链的烃类化合物——13-甲基-二十七烷，而云纹粉蝶翅腺分泌3个酸己酯：十四碳酸己酯、十六碳酸己酯和十八碳酸己酯。从褐窗蛱蝶（*Amauris ochlea*）的味刷分泌物中鉴定出顺式-茉莉酮。

研究得较为详尽的可算是斑蝶科的蝶类（表15-3），从雄性女王斑蝶（*Danaus gillippusberenice*）的味刷器官中鉴定出1种杂环酮化合物——2，3-二氢-7-甲基-1H-吡咯嗪酮-1。在同科其他种的雄蝶味刷中也发现该雄性信息素。随后的研究又从斑蝶的味刷器官中鉴定出3，4-二甲氧基-苯乙酮、3，7-二甲基-反-2-辛烯二醇-1，8、3，7-二甲基-反，反-2，6-癸二烯二醇-1，10、3，7-二甲基-10-羟基-反，反-2，6-癸二烯酸、3，7-二甲基-反，反-2，6-癸二烯双酸-1，10、十六碳醇醋酸酯、顺-11-十八碳烯醇醋酸酯。这之中有脂族化合物、杂环醛和苯乙酮，这些化合物的生物功能尚在研究之中。

**表15-3 部分雄蝶性信息素的化学成分**

| 昆虫名称 | 分泌部位 | 化学成分 |
|---|---|---|
| 苜蓿粉蝶（*Colias eurytheme*） | 翅腺 | 13-甲基-二十七烷 |
| 云纹粉蝶（*C. philodice*） | 翅腺 | 十四碳酸己酯、十六碳酸己酯、十八碳酸己酯 |
| 褐窗蛱蝶（*Amauris ochlea*） | 味刷 | 顺-茉莉酮 |
| 女王斑蝶（*Danaus gillippusberenice*） | 味刷 | 2，3-二氢-7-甲基-1H-吡咯嗪酮-1、3，4-二甲氧基-苯乙酮、3，7-二甲基-反-2-辛烯二醇-1，8、3，7-二甲基-反，反-2，6-癸二烯二醇-1，10、3，7-二甲基-10-羟基-反，反-2，6-癸二烯酸、3，7-二甲基-反，反-2，6-癸二烯双酸-1，10、十六碳醇醋酸酯、顺-11-十八碳烯醇醋酸酯 |

## 第二节 其他目昆虫的性信息素

除鳞翅目昆虫外，性信息素也广泛存在于双翅目、鞘翅目、膜翅目、蜚蠊目、同翅目和半翅目等部分昆虫中，由于其应用前景远不如鳞翅目昆虫性信息素，因此对这些目昆虫的性信息素研究相对较少。

### 1 雌虫产生的性信息素

双翅目、鞘翅目、膜翅目、蜚蠊目、同翅目等部分雌虫均产生性信息素，用以引诱同种雄虫或激发雄虫的性欲，后者常被称之为催欲剂，具有低挥发性，只能在短距离内发生

作用。

### 1.1　双翅目昆虫的性信息素

双翅目昆虫的性信息素化学结构研究仅限于几种常见蝇类（表 15-4）。从雌性家蝇（*Musca domestica*）的表皮蜡质中最先分离和鉴定出的性信息素为顺-9-二十三烯，进一步研究表明 4，8-二甲基二十七烷和 13-甲基二十九烷也是雌性家蝇的性信息素。一种面蝇（*M. autumnalis*）的性信息素有 3 种组分：顺-14-二十九烯、顺-13-二十九烯和顺-13-二十七烯。厩蝇（*Stomoxys calcitrans*）则是利用顺-9-三十一烯及顺-9-三十三烯作性信息素的。小家蝇的性信息素为顺-9-二十五烯或顺-11-三十一烯。可见，除实蝇（*Dacus oleae*）为 1，7-二氧螺旋［5，5］十一烷外，其他种类的性信息素都是利用不饱和烷烃化合物或醛类作性信息素的，碳原子个数从肉蝇（*Sarcophaga bullata*）的 6 个到采采蝇（*Glossina morsitans morsitans*）的 40 个不等。

Alberts 等（1981）对 *Bradysia impatiens* 的研究结果表明，当雌蝇引入雄蝇所在场所后，15、30、60s 的间隔期内雄蝇翅膀扇动率分别达 83.6%、64.4% 和 63.0%，逆风移动率分别达 12.3%、17.8% 和 31.5%，均极显著大于对照。表明 *Bradysia impatiens* 雌蝇存在着性信息素，但其化学成分仍未分离。

**表 15-4　部分双翅目昆虫性信息素的化学结构**

| 昆虫名称 | 化学结构 |
|---|---|
| 舌蝇科（Glossinidae） | |
| 采采蝇（*Glossina morsitans morsitans*） | 15，19，23-三甲基三十七烷、15，19-二甲基三十七烷、17，21-二甲基三十七烷 |
| 须舌蝇（*G. pallidipes*） | 13，17-二甲基三十五烷、15，19-二甲基三十五烷 |
| 家蝇科（Muscidae） | |
| 小家蝇（*Fannia canicularis*） | 顺-9-二十五烯 |
| *Fannia femoralis* | 顺-11-三十一烯 |
| *Fannia pusio* | 顺-11-三十一烯 |
| *Haematobia irritans* | 顺-9-三十烯 顺-5-三十烯 |
| 面蝇（*Musca autumnalis*） | 顺-14-二十九烯、顺-13-二十九烯和顺-13-二十七烯 |
| 家蝇（*Musca domestica*） | 顺-9-二十三烯 4，8-二甲基二十七烷和 13-甲基二十九烷 |
| 麻蝇科（Sarcophagidae） | |
| *Sarcophaga bullata* | 正己醛 |
| 尖眼蕈蚊科（Sciaridae） | |
| *Lycoriella mali* | 十七烷 |
| 厩蝇科（Stomoxyidae） | |
| 厩蝇（*Stomoxys calcitrans*） | 13-甲基-1-三十一醇、13-甲基-1-三十二醇、顺-9-三十一烯、顺-9-三十三烯 |
| 实蝇科（Trypetidae） | |
| 橄榄实蝇（*Dacus oleae*） | 1，7-二氧螺旋［5，5］十一烷 |

### 1.2　鞘翅目昆虫的信息素

鞘翅目是昆虫纲中最大的一个目，为害和破坏农作物、果园、森林、食品、家具和毛纺织品等，对人类造成无法估量的经济损失。

鞘翅目信息素化学结构鉴定的第一篇报告是在第 16 届国际昆虫学会年会上，由

Silverstein提出的。至今为止，已被鉴定出化学结构的鞘翅目信息素仍为数不多，分属9个科：小蠹科、叩头甲科、象甲科、金龟子科、拟步甲科、叶甲科、皮蠹科、窃蠹科和豆象科。从化学结构上看，这些甲虫的性信息素变化很大，甚至同一属或同一种的不同地理种群之间，也可以具有完全不同的性信息素成分（表15-5）。

**表15-5 鞘翅目昆虫性信息素的化学结构**

| 昆虫名称 | 化学结构 |
|---|---|
| 窃蠹科（Anobiidae） | |
| 日本烟草甲（*Lasioderma Serricorne*） | 4，6-二甲基-7-羟基壬酮-3 |
| 德国烟草甲（*L. Serricorne*） | 2，6-二乙基-3，5-二甲基-3，4-二氢-2H-吡喃 |
| 药材甲（*Stegobium paniceum*） | 2，3-二氢-2，3，5-三甲基-6-（1-甲基-2-氧丁基）-4H-吡喃-4-酮 |
| 豆象科（Bruchidae） | |
| 绿豆象（*Callosobruchus chinensis*） | E-3，7-二甲基-2-辛烯-1，8-二酸 |
| 菜豆象（*Acanthoscelides obtectus*） | （－）（E）-2，4，5-十四碳三烯酸甲酯 |
| 叶甲科（Chrysomelidae） | |
| 瓜十一星叶甲（*D. undecimpunctata*） | 10-甲基-2-十三酮 |
| 玉米幼芽根叶甲（*D. virgifera*） | 8-甲基-2-癸酸丙酯 |
| 金龟甲科（Scarabaeidae） | |
| 新西兰肋翅鳃金龟（*C. zealandica*） | 苯酚 |
| 日本金龟子（*Popillia japonica* | （R，Z）-5-（－）（癸-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮（R-对映体） |
| 红铜丽金龟（*Anomala rufocuprea*） | （Z）-5-十四碳烯酸甲酯 |
| 铜色丽金龟（*Anomala cuprea*） | （R，Z）-5-（－）（辛-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮<br>（R，Z）-5-（－）（癸-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮 |
| 宣氏丽金龟（*Anomala schonfeldti*） | （E）-2-壬烯醇-1 |
| 樱桃绿丽金龟（*Anomala daimiana*） | （E）-2-壬烯醇-1<br>（R，Z）-5-（－）（辛-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮 |
| 东方异丽金龟（*Anomala orientalis*） | （Z）-7-十三烯-2-酮 |
| 扁绿丽金龟（*Anomala octiescostata*） | （R，Z）-5-（－）（辛-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮<br>（R，Z）-5-（－）（癸-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮（8:2） |
| 白毛绿丽金龟奇岛亚种<br>*Anomala albopilosa sakishimana* | （R，Z）-5-（－）（辛-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮<br>（R，Z）-5-（－）（癸-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮（28:1） |
| 阿坂丽金龟（*Anomala azakana*） | （R，Z）-5-（－）（癸-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮（S-对映体） |
| 白毛亚金龟指名亚种<br>*Anomala albopilosa albopilosa* | （R，Z）-5-（－）（辛-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮（E）-2-壬烯醇，（E）-2-壬烯醛，苯甲酸甲酯（10:3:3:1） |
| 暗褐鳃角金龟（*H. parallela*） | 2-氨基戊酸甲酯 6-甲基-2，5-辛二烯-2-醇 |
| 黑七鳃金龟（*Heptophylla picea*） | R，Z-7，15-十六碳二烯-4-内酯 |
| 小蠹科（Scolytidae） | |
| 西部松大小蠹（*D. brevicomis*） | 挂-7-乙基-5-甲基-6，8-二氧杂双环-［3，2，1］-辛烷 |
| 南部松小蠹 | 马鞭烯酮 反-马鞭烯酮 |
| 西部松大小蠹 | 马鞭烯酮 反-马鞭烯酮 |
| 拟步甲科（Tenebrionidae） | |
| 杂拟谷盗（*Tribolium confusum*） | 1-十五烯、正-十六烷、1-十七烯和十七烷二烯烃 |
| 皮蠹科（Dermestidae） | |
| 黑斑皮蠹（*Trogoderma glabrum*） | 反-14-甲基-8-十六碳烯醛<br>顺-7-十六碳烯酸甲酯己酸和己内酯 |
| 谷斑皮蠹（*T. granarium*） | 反和顺-14-甲基-8-十六碳烯醛 |
| 肾斑皮蠹（*T. inclusum*） | 顺-14-甲基-8-十六碳烯醛 顺-14-甲基-8-十六碳烯醇 顺-14-甲基-8-十六碳烯醇甲酯 |

（续）

| 昆 虫 名 称 | 化 学 结 构 |
| --- | --- |
| *T. variabile* | 顺-14-甲基-8-十六碳烯醛 |
| 黄足圆皮蠹（*Anthrenus flavipes*） | 顺-3-十碳烯酸 |
| 大片黑皮蠹（*Attagenus megatoma*） | 反-3，顺-5-十四碳双烯酸 |
| *A. elongotulus* | 顺-3，顺-5-十四碳双烯酸 |
| 叩头甲科（Elateridae） | |
| 甜菜叩头甲（*Limonius californicus*） | 戊酸 |
| 太平洋岸叩头甲（*Limonius canus*） | 己酸 |
| 筒蠹科（Lymexylonidae） | |
| *Hylecoetus dermestoides* | 2，5-二甲基-2-异丙基-2，3-二氢呋喃 |

### 1.2.1 小蠹科（Scolytidae）

西部松大小蠹（*Dendroctonus brevicomis*）雌虫排泄的虫粪中含有1种引诱同种两性的聚集素。该聚集素经鉴定为挂-7-乙基-5-甲基-6，8-二氧杂双环-［3，2，1］-辛烷。国外商品名称为挂-西部松大小蠹诱。此外，在虫粪中还发现其立体异构体桥-西部松大小蠹诱。

马鞭烯酮和反-马鞭烯酮存在于小蠹种类中，如南部松小蠹、西部松大小蠹的雌虫后肠中都可分离得到这两种活性物质。

### 1.2.2 拟步甲科（Tenebrionidae）

杂拟谷盗（*Tribolium confusum*）雌虫释放1种引诱雄虫交尾行为的性信息素，经气相色谱分离和质谱结构鉴定为1-十五烯、正-十六烷、1-十七烯和十七烷二烯烃，前3个成分是引诱交尾行为的主要化合物。

### 1.2.3 豆象科（Bruchidae）

干豆象甲（*Acanthoscelides obtectus*）雄虫分泌的性信息素为（－）（E）-2，4，5-十四碳三烯酸甲酯。绿豆象（*C. chinensis*）则为单一的不饱和二元酸。

### 1.2.4 皮蠹科（Dermestidae）

黑斑皮蠹（*Trogoderma glabrum*）分泌的性信息素主要是14-甲基-反-8-十六碳烯醇-1，顺-7-十六碳烯酸甲酯，已酸和己内酯。谷斑皮蠹（*T. granarium*）从节间腹腺释放（反）或（顺）-14-甲基-8-十六碳烯醛。黄足圆皮蠹（*Anthrenus flavipes*）雌虫分泌顺-3-十碳烯酸作为性信息素以引诱雄虫。大片黑皮蠹（*Attagenus megatoma*）雌虫释放1种引诱并激起雄虫交尾行为的性信息素，其化学结构为反-3，顺-5-十四碳双烯酸。而另1种皮蠹（*A. elongotulus*）却利用其异构体顺-3，顺-5-十四碳双烯酸作为性信息素。

### 1.2.5 窃蠹科（Anobiidae）

日本烟草甲（*L. Serricorne*）的性信息素为单一成分，结构式为4，6-二甲基-7-羟基壬酮-3；而不同地理亚种的德国烟草甲（*L. Serricorne*）的性信息素却为2，6-二乙基-3，

5-二甲基-3，4-二氢-2H-吡喃，分子结构差异很大。药材甲（*Stegobium paniceum*）的性信息活性成分为2，3-二氢-2，3，5-三甲基-6-（1-甲基-2-氧丁基）-4H-吡喃-4-酮。

### 1.2.6 叩头甲科（Elateridae）

叩头甲科的甜菜叩头甲（*Limonius californicus*）雌虫在引诱雄虫时释放大量戊酸作性信息素，每头雌虫的释放量竟高达100μg。田间试验表明，许多同系列酸都无活性。同样，太平洋岸叩头甲（*L.canus*）的性信息素为已酸。

### 1.2.7 金龟子科（Scarabaeidae）

金龟甲类是重要农林害虫，在地下害虫中居首位。关于金龟甲类害虫性信息素的研究，从20世纪70年代开始有些报道。首先报道的是新西兰肋鳃金龟的雌成虫分泌的信息素，其次为日本金龟和20世纪80年代中期报道的红铜丽金龟。近年来进展较快，主要是日本蚕业及昆虫研究所的W S Leal等的工作，先后鉴定10种金龟甲类性信息素，故目前已经被鉴定的有13种金龟甲。

从目前已知的金龟甲类昆虫性信息素的结构来看，可以归纳以下几点：

(1) Leal在总结化学结构规律时指出，比较进化的种类丽金龟亚科（Rutelinae）用脂肪酸衍生物为其性信息素，比较原始的种类鳃角金龟亚科（Melcolonthinae）用比较普遍存在的化合物，或是一些信息素前体。但是也有例外，如黑七鳃金龟虽属于鳃角金龟亚科，但使用脂肪酸的衍生物为性信息素的成分。

(2) 有些种类的金龟甲类使用的化学成分虽然相同，但空间构型不同，也就是使用手性性信息素分子不同对映体作为种间隔离。如日本金龟的性信息素为R对映体，而阿坂丽金龟的性信息素为S对映体。

(3) 不同种类的金龟甲类使用相同的性信息素组分，利用地理位置和季节差别达到种间隔离。如扁绿金龟和白毛绿丽金龟的性信息素的两种组分相同，利用地理隔离达到种间隔离。铜色丽金龟与扁绿金龟性信息素也以这两种化合物为组分，繁殖季节不同而达到生殖隔离。

### 1.2.8 叶甲科（Chrysomelidae）

已发现的两种叶甲具有结构上完全不同的性信息素活性成分，其中瓜十一星叶甲（*Diabrotica undecimpunctata*）的性信息素成分为10-甲基-2-十三酮，而同属的玉米幼芽根叶甲（*D.virgifera*）则为8-甲基-2-癸酸丙酯。

## 1.3 同翅目昆虫的性信息素

同翅目中的介壳虫是农林生产上的大害虫，目前已鉴定出多种介壳虫性信息素的化学结构（表15-6）。其性信息素的化学结构分别为：红圆蚧（*Aonidiella aurantii*）—（3S，6R）-3-甲基-6-异丙烯基-9-癸烯-1-醇醋酸酯和（3S，6R）-3-甲基-6-异丙烯基-3，9-癸二烯-1-醇醋酸酯；黄圆蚧（*A.citrine*）—反-3，9-二甲基-6-异丙基-5，8-癸二烯-1-醇醋酸酯；梨圆蚧（*Quadraspidiotus perhiciosus*）—顺-3，7-二甲基-2，7-辛二烯-1-醇丙酸酯

（也称 SJS-1）和 3-甲基叉-7-甲基-7-辛烯-1-醇丙酸酯（也称 SJS-2）；桑白蚧（*Pseudaulacaspis pentagona*）—（3S，6R）-3，9-二甲基-6-异丙烯基-3，9-癸二烯-1-醇丙酸酯；康氏粉蚧（*Pseudococcus comstocki*）—2，6-二甲基-1，5-庚二烯-3-醇醋酸酯；橘臂纹粉蚧（*Planococcus citri*）—（1R-顺），（+）-2，2-二甲基-3-（1-甲基乙烯基）环丁烷乙醇醋酸酯。

表 15-6 同翅目昆虫性信息素化学成分

| 昆虫名称 | 化学成分 |
|---|---|
| 盾蚧科（Diaspididae） | |
| 红圆蚧（*Anonidiella aurantii*） | （3S，6R）-3-甲基-6-异丙烯基-9-癸烯-1-醇醋酸酯（3S，6R）-3-甲基-6-异丙烯基 3，9-癸二烯-1-醇醋酸酯 |
| 黄圆蚧（*A. citrana*） | 反-3，9-二甲基-6-异丙基-5，8-癸二烯-1-醇醋酸酯 |
| 梨圆蚧（*Quadraspidiotus perniciosus*） | 3-甲基叉-7-甲基-7-辛烯-1-醇丙酸酯<br>顺-3，7-二甲基-2，7-辛二烯-1-醇丙酸酯<br>反-3，7-二甲基-2，7-辛二烯-1-醇丙酸酯 |
| 桑白蚧（*Pseudaulacaspis pentagona*） | （3S，6R）-3，9-二甲基-6-异丙烯基-3，9-癸二烯-1-醇丙酸酯 |
| 粉蚧科（Pseudococcidae） | |
| 康氏粉蚧（*Pseudococcus comstocki*） | 2，6-二甲基-1，5-庚二烯-3-醇醋酸酯 |
| 橘臂纹粉蚧（*Planococcus citri*） | （1R-顺），（+）-2，2-二甲基-3-（1-甲基乙烯基）环丁烷乙醇醋酸酯 |
| 蚜科（Aphididae） | |
| 豆卫茅蚜（*Aphis fabae*） | （+）-（4aS，7S，7aR）荆介乳酸内酯（−）-（1R，4aS，7S，7aR）-荆介醇（29:1） |
| 巢菜修尾蚜（*Megoura viciae*） | （+）-（4aS，7S，7aR）-荆介乳酸内酯（−）-（1R，4aS，7S，7aR）-荆介醇（4-6:1） |
| 豌豆长管蚜（*Acyrthosiphon pisum*） | （+）-（4aS，7S，7aR）-荆介乳酸内酯（ ）-（1R，4aS，7S，7aR）-荆介醇（1:1） |
| 麦长管蚜（*Sitobion avenae*） | （+）-（4aS，7S，7aR）-荆介乳酸内酯 |
| 悬钩子长管蚜（*Sitobion fragariae*） | （+）-（4aS，7S，7aR）-荆介乳酸内酯 |
| 桃蚜（*Myzus persicae*） | （+）-（4aS，7S，7aR）-荆介乳酸内酯（−）-（1R，4aS，7S，7aR）-荆介醇（1:2） |
| 麦二叉蚜（*Schizaphis graminum*） | （+）-（4aS，7S，7aR）-荆介乳酸内酯<br>（−）-（1R，4aS，7S，7aR）-荆介醇（1:8） |
| 忽布疣蚜（*Phorodon humuli*） | （1R，4aR，7S，7aS）-荆介乳醇<br>（1S，4aR，7S，7aS）-荆介乳醇 |

蚜虫是另一类产生性信息素的重要农业害虫。早在 20 世纪 70 年代，Pettersson 等便证明二叉蚜属的卵生雌蚜通过释放挥发性的性信息素以引诱雄虫，这些性信息素由雌蚜后足胫节分泌。随后，Marsh 等和其他研究者也发现巢菜修尾蚜、豌豆长管蚜、麦二叉蚜和甘蓝蚜（*Brevicoryne brassicae*）的卵生雌蚜均产生性信息素来引诱同种雄蚜。

*M. viciae* 的性信息素由 2 种类单萜组成，它们分别是（+）-（4aS，7S，7aR）-荆介乳酸内酯（nepetalactone）和（−）-（1R，4aS，7S，7aR）-荆介醇（nepetalactol）这两个组分，它们以不同比例混合，也分别是豌豆长管蚜、桃蚜、黑豆蚜、豆卫茅蚜和麦二叉蚜的性信息素，而忽布疣蚜（*Phorodon humuli*）的卵生雌蚜的性信息素却仅有（4aR，7S，7aS）-荆介乳醇，虽然 1 位碳原子结构还未鉴定出来，但研究者们认为此种蚜的性信息素中包含 1R 和 1S 非对映异构体。

### 1.4 蜚蠊目昆虫的性信息素

蜚蠊是1种世界性卫生大害虫。在我国为害较严重的有美洲大蠊（*Periplaneta americana*）和德国小蠊（*Blattella germanica*）。据结构研究表明，美洲大蠊的性信息素为美洲大蠊酮-B。其天然光学异构体比其他异构体的活性大10万倍。德国小蠊的性信息素化学结构经研究证明有2种组分：3，11-二甲基-2-二十九酮和29-羧基-3，11-二甲基-2-二十九酮，其光学构型为3S，11S。后者的活性阈值为0.1μg，比前者大10倍，其他光学异构体略有活性（表15-7）。

表 15-7 蜚蠊目昆虫性信息素化学成分

| 昆虫名称 | 化学成分 |
|---|---|
| 姬蠊科（Blattellidae） | |
| 德国小蠊（*Blattella germanica*） | 3，11-二甲基-2-二十九酮 29-羧基-3，11-二甲基-2-二十九酮 |
| 蜚蠊科（Blattidae） | |
| 美洲大蠊（*Periplaneta americana*） | 美洲大蠊酮-B |

### 1.5 膜翅目昆虫的性信息素

红头松叶蜂（*Neodiprion lecontei*）、松黄叶蜂（*N. sertifer*）和美国白松叶蜂（*N. pinetum*）由雌性分泌而由雄性最强烈地感受的物质是3，7-二甲基十五烷-2-醇乙酸酯，而五针松叶蜂（*Diprion similis*）则是3，7-二甲基十五烷-2-醇丙酸酯。蜜蜂（*Apis mellifera*）蜂后的上颚腺分泌物（反）-9-氧-2-癸烯酸已被认为是性信息素的成分（表15-8）。

表 15-8 膜翅目昆虫性信息素化学成分

| 昆虫名称 | 化学成分 |
|---|---|
| 蜜蜂科（Apidae） | |
| 东方蜜蜂（*Apis cerana*） | 反-9-氧-2-癸烯酸 |
| 大蜜蜂（*Apis dorsata*） | 反-9-氧-2-癸烯酸 |
| 小蜜蜂（*Apis florea*） | 反-9-氧-2-癸烯酸 |
| 意大利蜂（*Apis mellifera*） | 反-9-氧-2-癸烯酸 反-9-羟-2-癸烯酸 |
| 锤角细蜂科（Diaprionidae） | |
| 红头松叶蜂（*Neodiprion lecontei*） | 3，7-二甲基十五烷-2-醇乙酸酯 |
| 松黄叶蜂（*N. sertifer*） | 3，7-二甲基十五烷-2-醇乙酸酯 |
| 美国白松叶蜂（*N. pinetum*） | 3，7-二甲基十五烷-2-醇乙酸酯 |
| 五针松叶蜂（*Diprion similis*） | 3，7-二甲基十五烷-2-醇丙酸酯 |
| 叶蜂科（Tenthredinidae） | |
| 云杉黄头叶蜂（*Pikonema alaskensis*） | 顺，顺-9，19-二十九二烯 顺，顺-9，19-三十一二烯 顺，顺-9，19-三十三二烯 顺，顺-9，19-三十五二烯 顺，顺-9，19-三十七二烯 |

## 2 雄虫产生的性信息素

鞘翅目昆虫的豆象科、象甲科、皮蠹科和小蠹科雄虫均具有分泌性信息素的习性（表15-9）。

表 15-9 几种昆虫的雄性信息素化学成分

| 昆虫名称 | 化学成分 |
|---|---|
| 鞘翅目 | |
| Burchidae | |
| *Acanthoscelides obtectus* | (－)-反-2，4，5-十四三烯甲酸酯 |
| 象甲科（*Curculionidae*） | |
| 棉铃象（*Anthonomus grandis*） | (＋)-顺-2-异丙烯基-1-甲基-环丁烷乙醇<br>顺-3，3-二甲基-$\Delta^{1,\beta}$-环己烷乙醇<br>顺-3，3-二甲基-$\Delta^{1,\alpha}$-环己烷乙醛<br>反-3，3-二甲基-$\Delta^{1,\alpha}$-环己烷乙醛 |
| 美核桃象甲（*Lurculio caryae*） | 顺-3，3-二甲基 $\Delta^{1,\beta}$-环己基乙醇 |
| 皮蠹科（Dermestidae） | |
| 白腹皮蠹（*Dermestes maculatus*） | 顺-9-十二烯异丙酯 顺-9-十四烯异丙酯<br>顺-9-十六烯异丙酯 |
| 小蠹科（Scolytidae） | |
| 五条齿小蠹 | (－)-2-甲基-6-亚甲基-7-辛烯醇-4 (＋)-顺式-马鞭烯醇 (＋)-2-甲基-6-亚甲基-2，7-辛二烯醇-4 |
| 西部松大小蠹（*D. brevicomis*） | 挂-7-乙基-5-甲基-6，8-二氧杂双环-[3，2，1]-辛烷，马鞭烯酮，反-马鞭烯酮 |
| 南部松小蠹 | 1，5-二甲基-6，8-二氧杂双环-[3，2，1]辛烷 马鞭烯酮，反-马鞭烯酮 |
| 云杉红翅小蠹（*D. Pseudotsugae*） | 3-甲基-2-环己烯醇-1 |
| 星形小蠹（*Pityogenes chalcographus*） | 2-乙基-1，6-二氧螺-[4，4]-壬烷 |
| 双翅目 | |
| 实蝇科（Trypetidae） | |
| 地中海实蝇（*Ceratitis capitata*） | 反-6-癸烯酸甲酯 反-6-癸烯醇 |
| 半翅目 | |
| 盾蝽科（Sculleridae） | |
| 扁盾蝽（*Eurygaster integriceps*） | 3-甲氧基-4 羟基苯甲醛，丙烯酸乙酯 |

象甲科中，从雄性棉铃象甲（*A. grandis*）中鉴定出 4 种成分的聚集素和性信息素：(＋)顺-2-异丙烯基-1-甲基环丁基乙醇、顺-3，3-二甲基 $\Delta^{1,\beta}$-环己基乙醇、顺-3，3-二甲基 $\Delta^{1,\alpha}$-环己基乙醛和反-3，3-二甲基 $\Delta^{1,\alpha}$-环己基乙醛。4 种组分组合在一起时才有活性。田间试验表明，上述化合物对棉铃象甲的引诱作用和活虫相当。美核桃象甲（*Lurculio caryae*）仅鉴定出顺-3，3-二甲基 $\Delta^{1,\beta}$-环己基乙醇一种成分。由于棉铃象甲的雄虫分泌的几种化合物对雌、雄两性均具有强烈的引诱作用，因此这类化合物也被称为聚集信息素。

皮蠹科中，分布于白腹皮蠹雄虫第 4 节腹板上具毛刷的上表皮腺，分泌出 4 种异丙酯，其中 3 种为雄虫的催欲剂。

豆象科中，菜豆象（*Acanthoscelides obtectus*）雄性信息素则为单成分，它从雄虫整体抽提物中分离，对同种雌虫具有强烈的吸引作用。

小蠹科中，从雄性加州五条齿小蠹的粪便中分离和鉴定出引诱两性聚集的 3 种萜烯醇化合物：(－)-2-甲基-6-亚甲基-7-辛烯醇-4（Ipsenol）、(＋)-顺式-马鞭烯醇、(＋)-2-甲基-6-亚甲基-2，7-辛二烯醇-4（Ipsdienol）。这 3 个化合物单独都没有引诱活性，而组合在一起时具有强烈的引诱活性。在齿小蠹属中的其他种类也发现这 3 个化合物。

西部松大小蠹（*Dendroctonus brevicomis*）雌虫排泄的虫粪中含有 1 种引诱同种两性的

聚集素。该聚集素经鉴定为挂-7-乙基-5-甲基-6，8-二氧杂双环-［3，2，1］-辛烷。国外商品名称为挂-西部松大小蠹诱。此外，在虫粪中还发现其立体异构体桥-西部松大小蠹诱。

从雄性南部松小蠹的后肠中分离并鉴定出另一种化学结构的活性成分，其结构为1，5-二甲基-6，8-二氧杂双环-［3，2，1］辛烷，该化合物又称南部松小蠹诱（frontolin）。3-甲基-2-环己烯醇-1是从云杉红翅小蠹（*D. pseudotsugae*）鉴定出来的信息素，商品名称为红翅小蠹诱（seudenol）。

马鞭烯酮和反-马鞭烯酮存在于许多小蠹种类中，如南部松小蠹、西部松大小蠹的雄虫后肠中都可分离得到这两种活性物质。从一种取食挪威云杉的雄性星形小蠹（*Pityogenes chalcographus*）中分离出一种独特结构的聚集素2-乙基-1，6-二氧螺-［4，4］-壬烷，称为星形小蠹诱（chalcogran）。

双翅目昆虫中雄蝇性信息素的发现仅限于实蝇科。研究表明，雄性地中海实蝇（*Ceratitis capitata*）分泌的信息素有二个组分，即反-6-壬烯酸甲酯和反-6-壬烯醇。一种昆士兰实蝇的性信息素至少有6个脂族胺所组成。此外，从雄性加勒比海实蝇（*Anastrephs suapemsa*）中分离出4种活性成分，初步鉴定为一个或二个双键的壬醇及分子量为196的二个乳酸酯化合物，只有4个组分混合在一起时才具较强的引诱作用。

从半翅目昆虫扁盾蝽 *Eurygaster integriceps* 雄性个体上收集到的气体挥发物中分离出的3-甲氧基-4-羟基苯甲醛和丙烯酸乙酯，相混后对同种雌虫具有性刺激作用和强烈的引诱活性。

## 第三节　性信息素的功能及分泌腺体

昆虫性信息素主要功能是引诱异性。除此而外，在不同的昆虫和同种不同性别的昆虫中，还具有多种多样的其他功能。

由于性信息素对昆虫的成功繁殖十分重要，因此，在长期的进化过程中，大多数昆虫形成了种类繁多、结构变异很大的专门分泌腺，用以合成和分泌性信息素。这些腺体常具有与合成和分泌相关的特化结构和调控手段。

### 1　性信息素的功能

#### 1.1　雌性信息素的功能

雌性信息素的功能是吸引雄性个体接近雌性个体，并引发雄性个体的求偶和交配行为。研究表明，虽然不同蛾类雌性信息素的释放行为不尽相同，但无太大的区别。棉铃虫释放性信息素时，两翅由静止时的屋脊状变为平伸，平覆于腹上，腹部末端经几次伸缩，露出黄色产卵瓣及其前方呈白色环状物的性信息素分泌腺。如无干扰，可保持此状态数小时，直至破晓。三化螟释放性信息素时，腹部向上弯曲，引起尾毛向上翘起；产卵器外伸，连续作微小的抖动或伸缩；暴露第8和第9节于空间，两翅略为平展，触角摆向前方或翅两侧。小地老虎雌蛾释放性信息素时，雌蛾停息于表面上，伸出产卵器，扇动着翅膀并有时作短距离飞行。与其他蛾类不同的是，产卵器伸出几秒或稍长时间后缩回，这种伸

出或缩回的动作持续几分钟后，雌蛾转移至另一处再重复这一系列动作。偶而，雌蛾将伸出的产卵器接触停息面且拖动，这被认为是分散香鳞的动作。

一般来讲，雌蛾释放的性信息素激起同种雄蛾显示一系列复杂的行为反应，归纳起来大致分为7个步骤：①兴奋；②起飞；③沿性信息素气迹定向飞行；④在释放源或雌蛾附近降落；⑤搜索释放源或雌蛾；⑥预交尾行为；⑦交尾。其中⑥和⑦又分别称为求偶行为和交配行为。

雄虫受性信息素气迹刺激后，行为反应的第一步是“兴奋”，表现为触角竖立，用前足不断清洁触角，爬行和振翅等。振翅行为在许多昆虫种类中是很明显的，推测有增加双翅肌肉温度的功能。当雄蛾起飞后，沿性信息素气迹作锯齿形逆风飞行，接近性信息素源释放点。

当雄蛾在信息素源附近降落后，搜索雌蛾，并接近雌蛾。至此，进入性行为的第二和第三阶段，即求偶和交配阶段。

### 1.2 雄性性信息素的功能

有关雄性性信息素的功能，不同的学者有各自不同的看法。且其功能随种类的不同而异。因而表现得异常复杂和不确定。但最主要的有以下几个方面：

#### 1.2.1 引诱功能

在灯蛾科的很多种类中，雄性性信息素用来引诱大批雄蛾形成交配聚集群（leks），接着雌蛾也被吸引，在此进行交配。这种蛾的雌蛾也具有性信息素，也可吸引雄蛾，但雌蛾只有在黄昏后3~4h才开始释放性信息素，可见，在此种蛾中，雌、雄蛾之间的吸引存在两种方式，它们在不同的交配时间分别发挥作用。

Landolt等（1989）发现粉纹夜蛾求偶时雄蛾也具有召唤姿式，并从腹部香刷中释放一种化合物以吸引几米远的雌蛾。雌蛾闻到气味后呈之字型逆风飞行接近雄蛾。

雄性非洲条螟（*Eldana saccharina*）释放化学引诱剂，长距离的引诱雌蛾。引诱时雄蛾采用典型的召唤行为，如振翅、展开腹部的大毛束。被引诱的雌蛾从几米远处步行穿过草丛寻找雄蛾。进一步的研究表明，雄蛾翅腺刺激雌蛾的寻找行为，而腹部毛束则激发雌蛾的翅膀扇动并接受雄蛾。类似地，米蛾（*Corcyra cephalonica*）雄蛾的翅腺由特化鳞片组成，这些鳞片沿前缘脉排列，接近翅关节，召唤时，引诱雌蛾逆风步行寻找。

蝙蝠蛾科的种类如雄性 *Hepialus hecta* 盘旋、静息或回旋而形成雄性聚集群，雌蛾被吸引而聚集于雄蛾聚集群处，进行交配。在北美洲，*H. sequoiolus* 静止于叶片上，展开后足胫节香刷，形成小型聚集群，吸引雌蛾进行交配。

螟蛾科中的5种贮藏物害虫地中海粉螟（*Ephestia kuehniella*）、烟草粉螟（*E. elutella*）、印度谷螟（*Plodia interpunctella*）、*Vitula edmandsae* 和粉斑螟（*Cadra cautella*）的雌蛾性信息素的主要成分均为E，E-9，12-十四碳二烯醇乙酸酯，它们同域发生，具有相同的求偶和交配时间，种间不可避免地交叉引诱。但雄性性信息素和求偶行为的差异避免了种间杂交。如烟草粉螟和 *Cadra figulilella* 之间的杂交便不可能。因为烟草粉螟雄蛾在求偶过程中用它的腹端接触 *C. figulilella* 头部时，后者降低腹部，采用拒绝

姿式，而当同种雄蛾采用这种拍头动作时，多数雌蛾却抬起腹部，采用接受姿式。Phelan (1984) 认为拍头使雄蛾将腹部毛束中的一些化学成分释放到雌蛾的接受器上，雌蛾凭此识别同种雄蛾，采用不同的姿式。

### 1.2.2 催欲作用

如卷蛾科中的很多种雄蛾以反式-肉桂酸和 2-表茉莉酸甲酯为雄性信息素，缺少反式-肉桂酸的雄蛾若用加入这种化合物的糖水饲喂，其交配比单独饲喂糖水的雄蛾高。一种夜蛾 *Pechipogon barbalis* (Cl.) 位于雄蛾胫节和腿节上的腺体分泌的物质可激起雌蛾性兴奋 (Illig, 1902)。亚麻灯蛾 (*Phragmatobia fuliginosa*) 和其近缘种伊莎贝尔虎蛾 (*P. isabella*) 的雄性信息素存在差异，前者主要为斑蝶酮 (danaidal)，后者则为羟基斑蝶酮 (hydroxydanaidal)。虽然这两种成分均可起催欲作用，但雌蛾对同种雄蛾释放的物质更为敏感。*Phlogophora meticulosa* 的毛束状分泌腺中包含有至少 3 种成分，当雄蛾飞近雌蛾时，将毛束展开。在小笼饲养中，展开毛束的雄蛾中有 87% 的个体成功交配，而 30 头移去了毛束的雄蛾却均未交配。雄性甘蓝夜蛾的毛束状腺体中具有催欲物质，当雄蛾接近雌蛾时刺激雌蛾采用召唤姿式并颤动翅膀。一种蝙蝠蛾 *Hepialus behrensi* (Stretch) 雄蛾足上散发一种对雌蛾有引诱力的气味 (Riley, 1895)，近缘种 *H. hectus* (L.) 雄虫胫节上的腺体散发一种对雌虫有引诱力的气味 (Deegener, 1904; Riley, 1895)。Deegener 描述这种气味"类似凤梨"，他还研究了腺体的解剖学和生理学。高加索蝙蝠蛾 *Phassus schamyl* (Chr.) 雄蛾胫节上具有气味腺体，能分泌一种对雌蛾有引诱力的物质 (Deegener, 1092)。

### 1.2.3 阻止其他雄蛾对雌蛾的定向

雄性信息素通过抑制雌蛾性信息素的释放或改变雌蛾性信息素成分而阻止其他雄蛾的接近。

烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 的香刷位于腹部第九节背侧面，当雄蛾接近一正在召唤的雌蛾时，香刷展开成扇状，从而使雌蛾停止召唤。

巢蛾属中的多数种类，雄蛾腹部具有发达的香刷，它们散发的气味可避免同属不同种巢蛾之间的错误交配，如双子叶树巢蛾 (*Yponomeuta evonymellus*)、苹巢蛾 (*Y. padella*) 和 *Y. cagnagellus* 在到达雌蛾后，快速振翅吹散释放出的雄性气味物质，阻止其他雄蛾的接近。

黎豆夜蛾 (*Anticarsia gemmatalis*) 雄蛾味刷分泌物主要成分是 (Z, Z, Z) -3, 6, 9-二十一碳三烯，这也是雌蛾性信息素的主要成分。当雄蛾翻出味刷接近雌蛾时，雄蛾性信息素成分释放，使雌蛾释放的性信息素主要成分增加，从而改变了雌蛾性信息素的组成比例，这导致沿雌蛾性信息素股流作之字形飞行的雄蛾停止寻找行动。

在行军虫 *Pseudaletia unipuncta* 中，雄蛾接近雌蛾后展开毛束，分泌物的主要功能是抑制其他雄蛾的接近，这是雄蛾利用分泌物进行交配竞争的第 1 例 (Hirai 等, 1978)。但 Fitzpatrick 等 (1988, 1989) 却认为这并不是直接抑制，而是雄性分泌物的释放影响了雌性信息素的股流成分，从而使随后接近雌蛾的雄蛾失去准确方向。

## 2 性信息素分泌腺

### 2.1 雌蛾性信息素分泌腺的结构

雌蛾释放信息素的腺体一般位于腹部第八节和第九节腹节间，由特化的节间膜组成。腺体的形状随种类不同而异。Gotz（1951）将蛾类性信息素分泌腺归为5类：①可移动的香味区；②可外翻的香环；③可外翻的香褶；④可外翻的香囊；⑤成对的香腺。

棉铃虫雌蛾的性信息素分泌腺是一个完整的上皮环，羽化2d雌蛾的腺体细胞方形，比未分化的上皮细胞大。腺体折皱，表面密布小毛，小毛无孔。类似的结构曾发现于枯叶蛾科的森林天幕毛虫、斑螟科一种干果螟、实夜蛾属的谷实夜蛾及美国棉铃虫等昆虫中。

螟蛾科昆虫的雌性信息素分泌腺一般为可外翻的背褶或背囊，位于腹部第8、9节间的节间膜背面。如红尾白螟（*Tryporyza intaca*）雌蛾性信息素分泌腺在自然状态下与第8、9节一起套缩于第7腹节内。在纵切面上，分泌腺呈"V"形，分泌腺细胞柱状，细胞基部与基底膜相连，顶部覆盖表皮层，腺体中央细胞较高，约50μm，边缘的细胞高度降低，由柱形变为扁平形，与一般的体壁上皮细胞相接。二点螟（*Chilo infuscatellus*）雌蛾性信息素的位置和结构与红尾白螟相似。玉米螟和二化螟的性信息素腺也位于腹部第8、9节间膜上，成褶叠囊状物。

### 2.2 雄蛾性信息素分泌腺的结构

鳞翅目昆虫的许多种类均具有发达的香味器官，它们位于腹部、胸部、足和翅上。这些器官的结构变异很大，从最简单的膨大鳞片或毛簇到结构复杂可外翻的腺体。这类外翻腺体常常具有特定的分泌区域、贮存结构和散发结构，并具有复杂的使腺体膨大、外翻的特殊机构，不使用时常藏于特定的袋或夹中。如翅腺在鳞翅目的许多科中广泛存在，它们的结构类似，主要由3部分组成：①腺体细胞及腺鳞，它们常位于翅折内或翅折外缘，其功能是分泌信息素；②毛刷鳞一般位于翅折外缘的折唇上，将信息素散发；③翅折则起保护作用，关闭时防止信息素不必要的蒸发。这些香味器官常用不同的名称来描述，如香鳞（androconial scales）、香扇（scent fans）、翅前缘毛（costal hairs）、香刷（brushes）、毛束（hair-pencils）和味刷（coremata）。在很多种蛾中，当雄蛾接近雌蛾时这类腺体外翻，并释放挥发性的化学物质（Birch等，1990）。

很多卷叶蛾雄蛾均具有外形特化的鳞片、袋状结构和可外翻的结构。如在枞色卷蛾（*Choristoneura fumiferana*）中，香鳞存在于翅和腹端（Palaniswany等，1979）。玫瑰色卷蛾（*C. rosaceana*）具有翅折，但无毛刷和腺鳞，唯一特化的鳞片是着生于翅折前缘并伸向翅折中的覆鳞，在组织切片上未见任何分泌细胞（Grant，1978）。在苹果异形小卷蛾（*Crytophlebia leucotrata*）中，雄蛾具有三组香鳞：一组是位于后翅的一条狭长带；第二组位于第7、8腹节上；第三组则由后足的胫节距转化而成，此距藏于布满后足的大鳞片中。三组香鳞在求偶过程的不同时期依次参与，但具体功能仍不太清楚，除催欲外，可能还与诱导雄蛾形成交配群和交配时的防御有关（Zagatti等，1987）。梨小食心虫（*Grapholitha molesta*）的雄性腺体位于尾端，由成对白色毛束组成，每个毛束由93个中

空的鳞片组成。分泌物除具催欲功能外，还可能参与交配时的防御、驱除其他雄蛾，并使雄蛾具有特殊气味以使雌蛾选择同种雄蛾交配，避免与交叉引诱而致的同属其他种雄蛾交配，从而在生殖隔离中发挥重要作用（George 等，1980）。

卷叶蛾科的许多种类其腺体位于前翅前缘，膜质的片状构造上具有特殊的鳞片，静止时卷曲，使部分翅面形成包皮，而腺体部分藏于转筒状结构内部。Grant（1978）报道，卷叶蛾科的黄卷蛾（*Archips argyrospilus*）和 *A. mortuanus* 的翅基部前缘脉附近有一明显的前缘折，此翅折向背卷曲，开口于背部，具有特化的鳞片，翅折达前缘长度的 1/4～1/3，当翅折打开时，露出由一簇长 1.0～1.5mm 的白色鳞片组成的毛刷，此簇鳞片位于翅基，沿翅折唇着生。翅折内着生有 100～300μm 长，30～70μm 宽的鳞片。在玫瑰黄卷蛾（*A. rosanus*）中，狭长的翅折约占翅长的 2/3，具有 2 个毛刷，每个长 1.5mm，其中之一位于翅基，沿着折唇着生，另一着生于翅折的 2/3 处，此处已无腺细胞，故当翅折关闭时，基部毛刷与散生于翅折内的腺鳞接触，但端部毛刷则否。翅折内壁覆有长 37μm，宽 10μm 的白色小型鳞片。巢黄卷蛾（*A. cerasivoranus*）的翅折占翅长的 1/4，毛刷位于折唇之上，毛刷鳞长 1.0～1.5mm，不如此属的其他种类发达。翅折内着生长 75～125μm，宽 20～35μm 的腺鳞，当毛刷内收时与翅折内的腺鳞接触。

由 1 000 种蛾类组成的灯蛾科中有大量种类具有味刷、可外翻的囊状或管状结构。这些结构被鳞片或毛层所覆盖，位于第 7、8 腹节腹板或生殖瓣两侧。由侧气管形成的气囊位于这些管状结构的基部。当气囊充气膨大时，使这些管状结构膨大并外翻。黑条灰灯蛾（*Creatonotus gangis*）和桑灰灯蛾（*C. transiens*）的味刷均十分发达，位于第 7 和第 8 腹板之间的空腔中，由两对长约 37mm 的管状物构成。其中较长的 1 对，其长度可达雄蛾体长的 1.5～2 倍，其上覆盖有 3 000 个鳞片（Wunderer 等，1986）。有趣的是，Schneider 等（1982）在研究黑条灰灯蛾的味刷时发现，田间抓获的雄蛾其味刷大小差异很大，其重量从 0.2～2.0μg，相差 10 倍，腺体大小与腺体内的性信息素含量密切相关。灰灯蛾属的雄蛾必需双吡咯烷生物碱（PAs）前体才能合成性信息素，PAs 则来源于幼虫的食料植物。他们将幼虫饲养在富含 PAs 和不含 PAs 的植物上，羽化的雄蛾味刷截然不同。前者很大，后者十分退化。采用触角电位测定不同处理腺体的生物效应也表明，退化的腺体引起的电位振幅很小。可见，幼虫食料中 PAs 的含量不仅影响雄蛾信息素的含量，而且影响腺体本身。顶灯蛾（*Estigmene acrea*）（Willis 等，1982）、亚麻灯蛾（*Phragmatobia fuliginosa*）和伊莎贝尔虎蛾（*P. isabella*）在腹部第 7、8 腹板间也具有味刷，亚麻灯蛾的味刷有身体 1/4 长，而伊莎贝尔虎蛾的达体长的 3/4（Krasnoff et al，1987，1989；Niesen，1982）。黄腹麻灯蛾（*Spilosoma lubricipeda*）和水灯蛾（*S. urticae*）的腹部第 7、8 腹板间也具有味刷，它们起源于围绕腹部的骨化带上（Rothschild，1961；1987）。但桑灰灯蛾（*C. transiens*）、褐斑灯蛾（*Utetheisa pulchella*）、*U. lotrix*、美丽灯蛾（*U. ornatrix*）的味刷着生于生殖瓣上，味刷壁薄，覆盖特化鳞片，凹入表皮质囊中，随腹部胀大而外翻（Conner 等，1980；1981）。

夜蛾科雄蛾的外翻腺体形状各异，可分布于足、胸和腹上，腹部的外翻腺体是鳞翅目昆虫中最为复杂的。

Grant（1971）对粉纹夜蛾（*T. ni*）的研究表明，雄蛾性信息素腺的分布非常复杂，

在雄蛾的第 5，6，7 节的腹侧具有成对的毛束，求偶时扇状展开。最大的信息素腺位于第 8 腹节的末端（腹末香腺），不用时内缩，套叠于第 7 腹节之内。雄性香味物质的产生和释放涉及到第 8 腹节腺体的 3 个不同的结构，每个结构均具有特化的鳞片和腺细胞。其中两个结构的鳞片构成不同的毛刷，分别称为大毛刷和小毛刷。其中大毛刷 1 对，位于第 8 腹节最下方的两侧，每个大毛刷与一发达的膜质突起相连，小毛刷 1 对，位于第 8 腹节侧面。第三个结构是指散生于腹折背壁上的腺鳞。当阳茎外翻时，腹末香腺随之外翻。外翻的动力是腹压，当阳茎内收时，腹末香腺随之内收，内收时由肌肉牵引。

烟芽夜蛾（*Heliothis virescens*）的香刷位于腹部第 9 节背侧面，当接近雌蛾时香刷展开成扇状（Teal 等，1981；Hendricks 等，1975）。黎豆夜蛾（*Anticarsia gemmatalis*）具有两对香刷，一对位于第 8 腹节中部，另一对位于第 9 腹节末端（Heath 等，1988）。杨裳夜蛾（*Catocala nupta*）中足胫节上有香刷，此香刷位于胫节沟内并被膨大的鳞片覆盖。其他裳夜蛾亚科的蛾类也具有相似的足上香刷，但这些香刷怎样外翻及是否具有分泌物均无研究（Birth，1979）。全须夜蛾亚科的种类如黏扇足夜蛾（*Paracolax derivalis*）前足基节、腿节、胫节上均具有成束的毛，但它们的功能仍不清楚。一种夜蛾 *Pechipogon barbalis*（Cl.）位于雄蛾胫节和腿节上的腺体分泌一种激起雌蛾性兴奋的物质（Illig，1902）。此外，在 *Phlogophora meticulosa*、蓓带夜蛾（*Mamestra configurata*）、甘蓝夜蛾（*Mamestra brassicae*）、粘虫（*Pseudaletia separata*）等雄蛾的腹前部发现了毛束状腺体，这些腺体均具有相似的结构，由一对香刷、香腺和存贮袋组成。一对香刷列生于骨化的杆状构造上，可被位于杆基的肌肉牵引而展开，其上的鳞片表面呈网格状，为分泌物的存贮和散发提供了巨大的表面；香腺由位于第 2 腹节的 Stobbe’s 腺体组成。

已研究的螟蛾科的种类其腺体有的位于前翅前缘，结构与卷叶蛾的相似，膜质的片状构造上具有特殊的鳞片，静止时卷曲，使部分翅面形成包皮，而腺体部分藏于卷筒状结构内部。如螟蛾科卷螟亚科的 *Vitula edmandsae* 的翅腺着生于卷叶蛾相同的位置，但腹向卷曲，开口于腹部。毛刷位于翅折的近端，鳞长 0.7～0.8mm；近毛刷鳞处有由呈匙形的腺鳞组成的分泌区，鳞长 250μm；稍远端还有另一群特化的鬃状中空鳞片；最远端具有另一束毛刷鳞。印度粉螟（*Plodia interpunctella*）翅折腺与 *V. edmandsae* 相似，毛刷位于翅折外缘近端，长 0.5～0.6mm；腺鳞散生于翅折内，长 35μm；外缘远端还有中空的鬃状鳞。*Cadra cautella* 的翅折腺与印度粉螟的非常相似，毛刷鳞长 0.4～0.6mm，但翅折内无任何腺鳞和腺细胞，可能不具有分泌功能（Grant，1978）。

地中海粉螟（*Ephestia kuehniella*）的第 7、8 腹节之间具有束状的特化鳞片。这些特化的鳞片内伸入毛原细胞，在细胞内形成由微管包围的存贮分泌物的腔；膜原细胞包围特化鳞片（Corbet 等，1977）。

巢蛾属中的多数种类，雄蛾腹部具有发达的香刷，它们散发的气味可避免同属不同种巢蛾之间的错误交配（Hendrikse 等，1984）。

窗蛾科的 *Striglina* 属雄蛾后翅后缘具有由 40～50 个特化鳞片组成的毛束（Whalley，1974）。

麦蛾科的马铃薯麦蛾（*Phthorimaea operculella*）的后翅上具有香刷，在求偶时展开，但雌蛾的行为反应尚未进行研究（Ono，1979）。

尺蛾科的很多种雄蛾具有香刷或味刷，这些腺体多数存在于雄蛾生殖器旁，随生殖器的外伸而展开，形成掌状结构（Aplin 等，1970）。

多数蝙蝠蛾科的种类后足胫节上具有发达的香刷，从而使后足失去正常的生理功能。

烟草天蛾（*Manduca sexta*）的第 2 腹节具有位于腹面的味刷。味刷藏于腹侧的浅袋中，每个味刷长 6mm，位于第 2、3 腹节腹板旁的膜质表皮上，节间膜将味刷袋分为两个功能区，味刷袋前半部分（位于第 2 腹节）着生味刷，后半部分（位于第 3 腹节）散生着很多细小的鳞片。当味刷收于袋中时，其端半段与袋中的细小鳞片紧密接触。由于味刷袋具有发达的背唇和腹唇，味刷能很好地固着在袋中。这种味刷藏于夹中或袋中的结构是雄蛾味腺理想的功能性结构（Grant 等，1973）。

### 2.3 其他目昆虫的外分泌腺

在蚜虫 *Schizaphis borealis* 中，雄虫不能辨认已经除去后足的雌虫，但是雄虫被切下的雌虫足所引诱。雌虫的后足胫节有假鼻片，膜上密密地覆盖着细沟或具有波状起伏形式的凹陷。推断性信息素的散发器官位于卵生雌蚜虫的后足胫节上（Pettersson，1970，1971）。

Alberts 等（1981）将 *Bradysia impatiens* 雌虫匀浆后用二氯甲烷提取或直接提取，在 30FE（雌蝇当量）浓度下测定对雄蝇的反应，匀浆提取液刺激和扇翅反应最高为 30.1%，而直接提取达 51.3%，逆风定向飞行前者为 14.5%，后者达 47.5%；表明性信息素存在于雌蝇表面，用二氯甲烷分别提取头、胸、腹、足生测表明雄虫对足提取液反应最强，扇翅和定向反应分别达 55.2% 和 52.2%，显著高于其他部位提取液的反应，其次为胸部，而以腹部最低，表明其性信息素分泌腺位于足上。

膜翅目昆虫中有很多种类其腿上长着各类腺体。长刷蜂属许多种类雄蜂后足腿节和胫节极度膨大，由两个叶状物（一个在胫节，另一个在腿节）组成的大腺体充塞了这些没有肌肉的肢节（Stort & Cruz L，1965；Williams 等，1982）。两个叶状物有一条共同的导管，穿过跗节开口在前跗节的中垫上（根据 Stort & Cruz L）或开口在胫节的端部（根据 Williams 等）。腿节内的腺体是被分泌细胞所包围的袋状构造，其中显然不存在小导管。

已有人用长舌蜂（*Euglossa cordata*）、丰蜂（*Euglossa violacens*）和 *Euglossa nigrita* 为材料研究了这些胫节的形态和细微结构（Cruz L 等，1965；Sakagami，1965）。密被细毛的槽与表皮质的空腔相通，后者占据胫节大部，因此，从横切面看该胫节大致表现为两个同心环和一条沟。其分泌物可引诱雌蜂。

此外，鳃角金龟亚科性信息素腺体是最后两节腹板和肛上板的上皮细胞（刘孟英，1997）。

## 第四节 性信息素的生物合成

在昆虫体内，脂肪、碳水化合物和蛋白质相互转化的代谢途径相当发达，而且昆虫体内存在着大量合成脂肪和蜡质所需的重要脂族烃类衍生物，如直链脂肪酸、脂肪醇和烷烃衍生物等。当昆虫的信息素腺体发育成熟后，可以利用这些脂族化合物经一定的转化途径合成信息素，并由腺体释放至外界。

## 1　信息素生物合成的前体

所谓信息素的前体，即昆虫在体内合成信息素的起始原料或中间体。

昆虫信息素的前体按其来源大致分为2类：①来自于寄主作物；②利用特殊腺体组织中的类脂体。利用寄主作物中存在的特殊成分作前体的突出例子是斑蝶属的雄蝶性信息素，其前体是取自于寄主作物中的吡咯烷生物碱，经体内的简单转化而生成吡咯烷信息素。棉铃象甲释放由四个萜烯醇和醛所组成的聚集素，雄性棉铃象甲是利用棉铃中的几个单萜烯类化合物，诸如香叶烯、罗勒烯、橙花醇和牻牛儿醇作为信息素的前体。一种小蠹科的蠹虫，它们的聚集素由一类萜烯醇组成，其生物合成的前体取自于寄主树中的特殊成分香叶烯和α-蒎烯。

大多数鳞翅目蛾类性信息素的前体主要是腺体组织中的类脂体。例如雌蛾性信息素腺体中存在着和信息素碳链长短、不饱和双键数目和位置相同的脂肪酸前体。这类脂肪酸前体以酯链、酰基丙三醇和磷酸酰基丙三醇的形式存在于腺体中，是信息素腺体细胞膜的一种结构成分。在雌蛾性成熟后，利用这些前体经不同的途径合成信息素。据研究表明，有些种类的雌蛾则是利用饱和的十八碳酸作为合成信息素的基本原料，经多种生物合成途径而产生信息素。采用单个性信息素腺体的超微量碱性甲基化反应和毛细管色谱分析技术证实，在粉纹夜蛾［Trichoplusiani (Hubner)］的腺体中存在6个性信息素成分的前体中间物。如十二烷、Z-5-十二碳烯、Z-7-十二碳烯、11-十二碳烯等。

## 2　若干典型的生物合成途径

### 2.1　鳞翅目雌蛾性信息素的一般合成途径

近年来研究了家蚕、粉纹夜蛾、红带卷蛾（*Argyrotaenia velutinana*）、枞色卷蛾（*Choristoneura fumiferana*）和烟芽夜蛾（*Heliothis virescens*）等多种雌蛾的性信息素合成路线（图15-1）。

多数鳞翅目雌蛾的性信息素由相同碳链、双键位置和空间结构的脂肪酸合成，合成部位为昆虫的性信息素腺。典型的合成路线始于乙酸或乙酰辅酶A，通过脂肪酶合成酶的催化作用转化成软脂酸。但贮存的一些其他有机酸，如油酸、亚油酸或亚麻酸，甚至氨基酸，也可被某些特定种类的昆虫用来合成性信息素。随后的步骤由两个关键性酶控制，一个是微粒体氧化酶，另一是△11脱氢酶。前者催化碳链的截短，每催化1次截去2个碳原子；后者催化碳链上11～12位的脱氢。有证据表明，在鳞翅目昆虫中存在不同类型的△11脱氢酶。显然，脂肪酸链的长短、截去碳原子和脱氢的位置、顺序和次数、双键的几何结构及官能团的差异，构成了鳞翅目昆虫性信息素的多样性。

此外，在昆虫体内也发现有△9脱氢酶系统，因此，昆虫性信息素腺体内大量存在的油酸和棕榈酸也可以作为信息素的前体。

红带卷叶蛾的性信息素（十四醇乙酸酯，顺-11-十四碳烯醇乙酸酯，反-11-十四碳烯醇乙酸酯，11-十二碳烯醇乙酸酯，顺-9-十二碳烯醇乙酸酯，反-9-十二碳烯醇乙酸酯）是由饱和十六酸酰基经β-氧化碳链缩短反应生成十四碳酰基，再经△11脱氢酶系的作用形

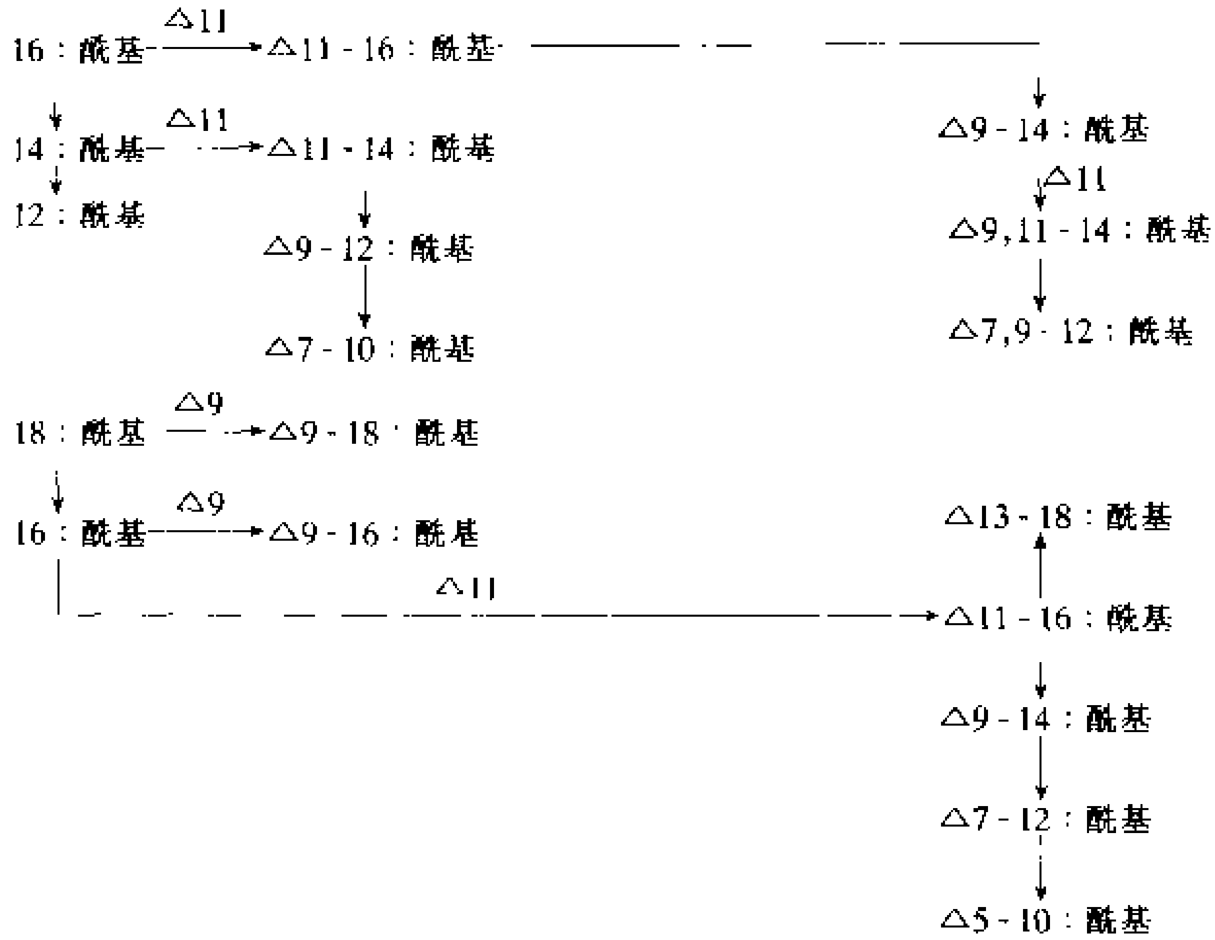



图 15-1 鳞翅目雌虫性信息素合成的典型途径

成 11-十四碳烯酰基，随后还原并乙酰化而生成 11-十四碳烯醇乙本酸酯；而在相同的酶系作用下又可得到 11-十二碳烯醇乙酸酯，顺-9-十二碳烯醇乙酸酯，反-9-十二碳烯醇乙酸酯。粉纹夜蛾的性信息素则是从饱和十八碳酰基和十六碳酰基出发经△11 位脱氢和碳链缩短等不同途径分别得到十二碳烯醇乙酸酯，顺-7-十二碳烯醇乙酸酯，11-十二碳烯醇乙酸酯，顺-7-十四碳烯醇乙酸酯和顺-9-十二碳烯醇乙酸酯。

## 2.2 几种鳞翅目雄蛾性信息素的合成途径

鳞翅目雄蛾产生的信息素的生物合成途径颇为复杂。例如夜蛾科的东方黏虫和披肩黏虫的雄性信息素各自为苯乙醇和苯甲醛，由位于腹端的香刷释放。研究表明，上述 2 种信息素分别以苯乙基-β-糖苷和苯基-β-糖苷的形式贮于腺体中。当释放信息素时，上述糖苷途经一种特殊管道和水解酶、β-糖苷酶混合，分解为信息素和己糖，由味刷释放至体外。大蜡螟的雄性信息素为壬醛和十一碳醛。据报道，壬醇的生物合成途径可通过利用油酸作为前体，以 β-氧化反应连续断裂碳链或直接断裂双键而得到壬醛。

## 2.3 雄斑蝶性信息素的合成途径

鳞翅目的蝶类，由雄蝶释放信息素引诱雌蝶。如斑蝶属一种雄蝶的信息素为吡咯烷，这种雄蝶是从取食的寄主作物中得到信息素的前体——吡咯烷生物碱，并经简单的水解途径而得到吡咯烷。

## 2.4 几种鞘翅目昆虫性信息素的合成途径

棉铃象甲的雄性信息素为 4 个单萜烯醇和醛的化合物，早期试验结果表明，这些物质的产生与棉铃象甲取食食物的种类和数量密切相关。用棉蕾饲养的雄虫每天产生的性信息

素明显多于用人工饲料饲养的。据此，研究者认为该虫性信息素的4个组分的前体均来源于棉蕾中的萜烯类化合物——反罗勒烯和香叶烯，采用氚标记的实验证实了上述推论。但随后的研究者采用标记的脂肪酸乙酸酯、脂肪酸甲羟戊酸酯和葡萄糖作为前体物的研究表明，该虫也能从头合成这4种组分. 不过对这几种前体物的利用效率只有反罗勒烯和香叶烯的1/13。这一结果表明，雄性信息素的合成过程中，棉铃象甲优先经济利用棉蕾内的萜烯，但当食物内萜烯类化合物缺少时，也可利用脂肪酸和葡萄糖从头合成，但合成数量少，能耗大。

鞘翅目小蠹科许多种类释放若干萜烯醇化合物为聚集素。这些化合物存在于蠹虫的后肠和虫粪中。研究表明，小蠹虫能利用寄主树中的香叶烯和α-蒎烯转化成聚集素。加州五点齿小蠹（*Ips paraconfusus*）竟能利用后肠中的一种微生物将α-蒎烯转化成顺式和反式马鞭烯醇，而转化产物正是聚集素成分。

金龟甲性信息素的生物合成研究主要由Leal（1996）报道，他研究了丽金龟属的性信息素主要成分（R, Z)-5-（－）（癸-1-烯基）氧杂戊烷-2-酮合成途径。将氘代棕榈油酸点滴到腺体表面，经培育可以得到氘代信息素，表明该含有环状结构的性信息素的合成是经过β-氧化、丙烯基氧化和环化反应而得到。同样，用氘代的饱和脂肪酸进行培育也可以得到氘代标记的性信息素，说明金龟甲类昆虫的生物合成也利用δ-9-去不饱和作用得到性信息素。

至今为止，昆虫信息素的生物合成途径研究还仅限于表面的生化过程，尚未涉及到昆虫体内如何精确地控制生物合成的实质问题。可以预料，对昆虫信息素生物合成途径的研究和详尽了解有助于剖析和翻译雌蛾释放的完整化学通信系统，回答许多目前无法解答的实际应用问题。

## 第五节 昆虫内分泌系统的调控作用

影响蛾类性信息素产生的生理和环境因素很多，包括蛾的年龄、光周期、接受交配的次数及间隔期、光照强度、温度、风速、是否存在植被及植被的性质。一般来讲，昆虫在性成熟之前是不会释放信息素的，它和卵巢发育程度相关。交配后，信息素的合成和释放就被永久或暂时性终止。鳞翅目雌蛾释放性信息素仅在每天的求偶活动期间，表现出明显的昼夜节律性。如在粉纹夜蛾中，高滴度的性信息素一直存在于腺体中，但只有在晚上才被输送到腺体的表面而释放出来（Hunt等，1990）。在美洲棉铃虫中，羽化当晚性信息素含量约为50ng/雌，以后逐渐升高，第3晚达最高峰，约120ng/雌，召唤活动也达最高峰，多数雌蛾的交配便发生在第3晚（Callahan，1958），以后随蛾龄增大而逐降。在第3晚，天黑后1h性信息素开始升高，召唤活动也同时出现，天黑后4～6h性信息素含量达最高峰，召唤活动也最剧烈，至天黑后7h两者同时下降（Raina等，1986）。在荷兰石竹小卷蛾中，性信息素含量在召唤前最大，而召唤行为的发生引起其滴度锐减（Webster等，1982）。在舞毒蛾中，性信息素滴度在白昼时达最大，恰好与它的交配期相遇（Giebultowicz等，1992；Tang等，1992）。由于生物钟由神经因子调控，性信息素活动的节律性表明昆虫性信息素的合成和释放受到神经中枢或神经内分泌的调节。

## 1　神经内分泌对昆虫信息素的调控

根据鳞翅目天蚕蛾类和蜚蠊的生殖周期特性，Barth 在 1965 年提出了一个假设，这一假设就成虫期的交配和产卵方式将昆虫分为两类：一类成虫寿命较长，具有明显的生殖间隔期，这些生殖间隔期将成虫期分隔成多次交配和产卵高峰，而在生殖间隔期内，昆虫不适宜进行交配或不可能进行交配；另一类成虫寿命较短，不存在生殖间隔期。Barth 认为，只有第一类成虫的交配行为受神经内分泌调控，而对于那些成虫寿命短的昆虫，并不存在这种调控作用。

20 世纪 60 年代后期和 70 年代初期的研究结果都支持这一假设。如 Barth 等（1965）对寿命较短的大蜡螟（*Galleria mellonella*）和柞蚕（*Antheraea pernyi*）的研究结果表明，摘除咽侧体对性信息素的产生无影响。而对多种卵胎生蜚蠊的生殖研究却发现雌虫在生殖周期的产卵前期才接受交配，而在排卵和产卵、妊娠期并不能进行交配，只有在分娩后开始第二个产卵前期，交配才能重新进行。在这些昆虫中生殖周期是咽侧体周期性活动的结果，因而这些结果是支持 Barth 假设的。但随后越来越多的研究又提出了具有中间类型生殖周期的昆虫神经内分泌对交配行为的控制问题，即使这些具有极端生殖周期类型的天蚕蛾类，也提出了神经内分泌对交配行为的控制问题，值得进一步研究，Barth 提出的假设也需要完善与修正。

## 2　保幼激素和蜕皮激素对于信息素的调控

保幼激素和蜕皮激素对生殖的调控作用得到了广泛的研究。这两种激素虽然在不同昆虫中主要作用存在差异，但都能促进生殖细胞分化、卵黄发生、附腺发育，以及启动生殖相关的代谢过程。早在 1960 年 Engelmann 对马德拉蜚蠊（*Leucophaea maderae*）的研究证明，咽侧体是成虫交配所必需的，如果切除咽侧体，则需给予性信息素，成虫才能恢复交配，说明咽侧体影响信息素的产生和释放。此外，咽侧体还影响卵巢发育，但切除卵巢并不影响成虫交配，可见，卵巢不是马德拉蜚蠊交配所必需的。

双翅目性信息素已在 12 科 43 种中开展了研究，现已知结构的有 17 种，其中家蝇的性信息素（主要成分 Z-9-二十三烯）称为 muscalure 是研究得最清楚的一种。结果表明，家蝇性信息素的产生、引诱雄虫和卵母细胞的发育密切相关。当雌蝇的卵母细胞从第四期开始沉积卵黄物质时，性信息素也同时产生，且在此时表现出对成熟雄蝇的引诱作用。如果雌虫在羽化后切除了卵巢，则虫体不能产生性信息素，植入卵黄发生早期卵巢，不但卵巢发育成熟，而且能恢复性信息素的合成，现已明确家蝇的咽侧体—心侧体复合体（环腺）不影响性信息素的产生，而影响卵巢发育，而卵巢发育过程中合成的 α-蜕皮激素转化为 β-蜕皮甾酮后，可同时调节脂肪体合成卵黄原蛋白和性信息素的产生。

Menson 在研究黄粉虫（*Tenebrio molitor*）产生雌性信息素的神经内分泌调控时指出，活化的咽侧体是产生性信息素所必需的，且咽侧体必需与脑具有完整的神经联系时才具有促性信息素活性。Hughes 根据研究结果认为，成虫取食后，膨胀的胃解除了咽侧体的神经抑制，从而导致信息素的产生。后来 Bridges 的实验证明，黄粉虫中信息素的产生是直接受保幼激素刺激的。

鳞翅目昆虫的生殖周期类型因成虫寿命、取食情况、卵黄发生等不同而异，是昆虫中最为复杂的类型。根据激素对生殖调节的模式可分成三种类型：一类是成虫需要取食，卵黄发生由保幼激素调节的蝶类；另一类是成虫不需要取食，羽化不久即产卵的蚕蛾类；第三类是成虫需要补充营养后卵巢才发育成熟，很多夜蛾、螟蛾类农业害虫属于此类。已经知道保幼激素参与调节生殖过程，但具体的调节方式和作用过程并不十分清楚。

究竟哪些神经内分泌器官影响其性信息素和性行为？由于昆虫性行为是环境因子和生理因子作用的综合反应，以及鳞翅目生殖类型的多样，因而很多关于神经内分泌对昆虫性行为调节的实验结果难于得到统一的结论。最早 Barth 的假设认为天蚕蛾信息素产生和释放与咽侧体无关，但后来实验证明如果用早熟素（precocene Ⅱ）处理小菜蛾（*Plutella xylostella*）即能减低其性吸引。Riddiford 和 Williams 的实验表明，心侧体可能释放一种激素控制昆虫的召唤行为，当时称这种激素为召唤激素（Calling hormone）。以后，Sasaki，Hollander 和 Yin，Raina 等大量的实验得到了比较一致的结论：认为来自脑部的神经信号，可能直接调控性信息素的合成和释放。

蜱的研究种类有 5 属 14 种，蜱性信息素是来自子窝腺（foveal）的 2，6-二氯酚，当用 20-羟基蜕皮酮或 22，25-双脱氧蜕皮酮处理嗜驼璃眼蜱（*Hyalomma dromedarii*）可使信息素增加，但离体条件下蜕皮素的作用可能要通过别的途径。Sonenshine 等在 1985 年证明邻苯二酚胺类神经递质激活性信息素的活性，所以同样存在神经内分泌的调节。

## 3 信息素生物合成活化神经肽的作用

PBAN 由咽下神经节产生，是一种具有 33 个氨基酸的多肽，可刺激蛾类性信息素的合成与释放，其详细内容可参考第 6 章第 10 节。

## 4 性信息素产生和释放的调控模式

昆虫的性行为生理活动是对于环境和生理诸多因子的复合反应，性信息素的产生和释放同样是在神经内分泌调节作用下的综合反应。Raina 以美洲棉铃虫性信息素的产生和内外因子的关系作了比较系统的说明，图 15-2 说明 PBAN 的产生和释放受到寄主植物、光周期、温度等环境因子的影响。

寄主植物　寄主植物中的某些次生物质或某生长期作为 PBAN 从中枢神经系统释放的信号，美洲棉铃虫以玉米穗丝作为 PBAN 释放的信号，多音天蚕蛾以橡树叶中反-2-己醛物质为信号，这种对于寄主植物的反应性在野外的和实验室饲养的昆虫中具有明显差别，在实验室多代饲养后对寄主植物的反应明显减弱。

光周期　昆虫性信息素的产生和释放有一定的光周期节律，同样 PBAN 在体内的释放也是受光周期节律调控。美洲棉铃虫的 PBAN 是在暗周期从咽下神经节经心侧体释放到血淋巴中，至于光信号如何调节体内的 PBAN 水平，还不清楚，可能暗信号能活化 PBAN，而光信号活化一种降解酶使 PBAN 钝化。

生物合成酶　昆虫性信息素的生物合成和生物合成酶方面已有诸多研究，但 PBAN 如何活化性信息素的产生还不太清楚。

性抑制因子（SSF）　已经交配的雌虫不再有召唤反应，性信息素迅速下降，终止性

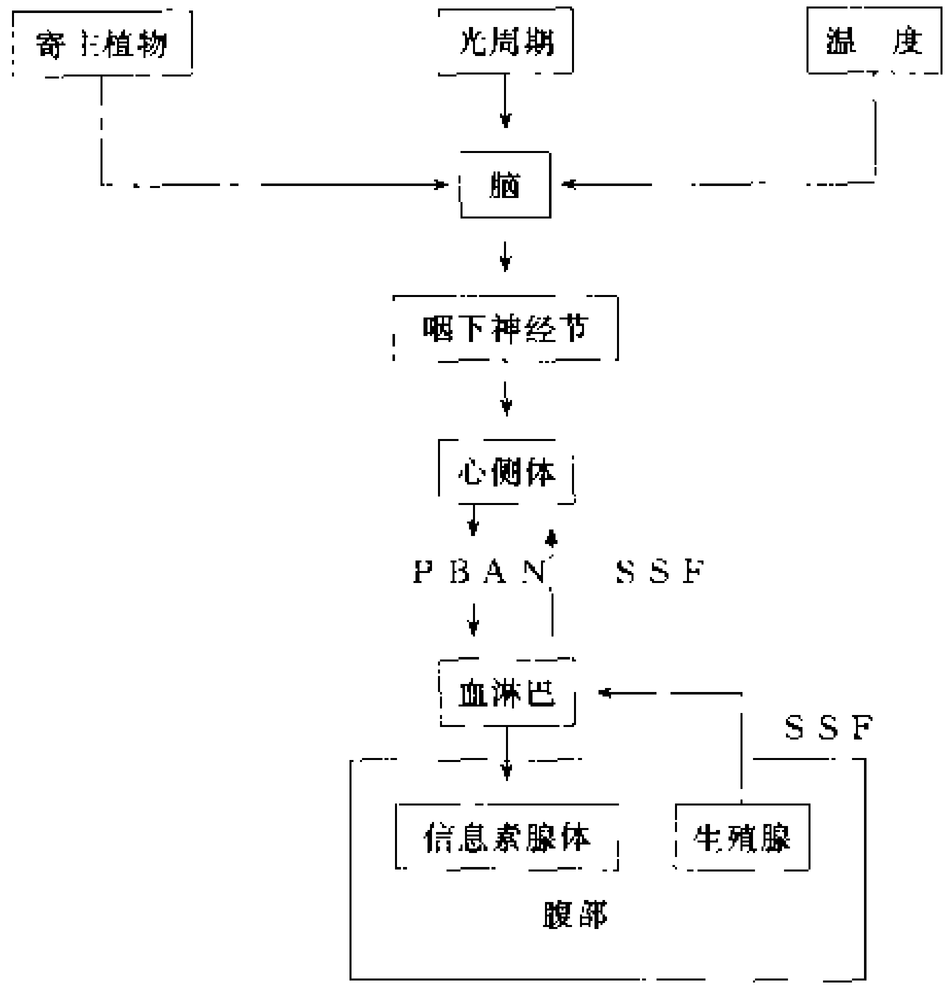



图 15-2 美洲棉铃虫性信息素产生的调控模式

信息素产生的信号来自于雄虫的一个因子称为性抑制因子。实验结果表明，SSF 来自雄性附腺的一种性肽，同样在已经交配的美洲棉铃虫再注射脑—咽下神经节复合体的匀浆液或部分纯化的 PBAN，均能使性信息素恢复到未交配的水平，这表明 SSF 和 PBAN 的相互作用在调节性信息素的水平。

Cusson 以黏虫（*Pseudalitia unipuncta*）为例提出了 JH-PBAN 关系的调控模式：昆虫性行为活动中包括着性信息素的产生、释放、召唤、交配等一系列活动。Cusson 根据黏虫生殖特点，即成虫羽化后需要补充营养，促使卵巢发育和进行交配，其卵巢发育延迟时间同温度、光周期、迁飞、补充营养等密切相关，提出了 JH 在调节召唤行为和 PBAN 释放中的二个作用途径，其实验结果表明：季节、环境、迁飞等环境因素首先影响中枢神经系统，释放促咽侧体活化激素或抑制激素（AT 或 AS），促进或抑制 JH 的释放。JH 作用于中枢神经系统，一方面释放 PBAN 促使性信息素产生和释放，另一方面中枢神经信号给予肌肉系统，产生召唤行为，说明召唤和性信息素产生受不同因子控制。

## 第六节 性信息素的协同效应及应用

由于性信息素具有使用剂量低、专一性强、不污染环境、害虫不易产生抗性等优点，因而具有重要的田间应用价值。尤其是鳞翅目害虫的性信息素，直接应用于田间已达几十年，有的甚至成为治理害虫的主要手段。

### 1 性信息素与其他化合物的协同作用

研究者发现，若能在性信息素中加入少量增效剂，更能发挥其引诱活性，这些增效剂

包括食物引诱剂、利它素和其他很多目前仍不知其确切功能的化合物。

### 1.1 性信息素与食物引诱剂合用

金龟甲类性信息素的应用比较成功的事例是日本龟诱（Japonilure）。在发现性信息素以前，已经发现一种食物引诱剂，由苯乙基丙酸酯和丁子香酚（eugenol）以3:7比例的混合物组成，并有商品出售。在性信息素研究成功后，立即进行田间诱捕试验，目的是研究单独使用性信息素和与食物引诱剂混合使用的效果。日本龟诱，单独使用只能引诱雄虫，与食物引诱剂混合使用（复合诱芯），可以同时引诱雄虫和雌虫，并比单独使用多引诱几倍的甲虫。扁绿丽金龟的性信息素的引诱作用与食物引诱剂（1-甲基-4-丙烯基苯，香叶醇，苯乙基丙酸酯，比例为9:0.5:0.5）合用，可增强对雌虫的引诱作用。

西部松大小蠹（*Dendroctonus brevicomis*）雌虫排泄的虫粪中含有一种引诱同种两性的聚集素。该聚集素经鉴定为挂-7-乙基-5-甲基-6，8-二氧杂双环-［3，2，1］-辛烷。国外商品名称为挂-西部松大小蠹诱。此外，在虫粪中还发现其立体异构体桥。同时，从寄主山松树中分离得到一种具增效作用的萜烯化合物——香叶烯。在上述化合物中加入香叶烯后，引诱活性大幅度提高

### 1.2 性信息素与利它素合用

扁绿金龟的性信息素的引诱作用被植物蒲公英花分泌的利它素增强。利它素的组分为顺-3-已烯基乙酸酯，苯甲醛，苯甲醇，苯乙醇，苯乙腈和苯甲酸卞酯（4:8:14:3:5:19:11），对雄虫引诱有增效作用。

### 1.3 性信息素与其他物质的协同作用

很多天然的化学物质也能增加性信息素对异性的引诱作用，但其作用机理却不十分清楚。

从雌性家蝇的表皮蜡质中分离和鉴定出性信息素为顺-9-二十三烯。将多种顺9长碳链烯烃同系物分别加入顺-9-二十三烯中，发现顺-9-二十一烯具强烈的增效作用。这两种物质相混后构成的所谓定向信息素（Orientation pheromone）先后由美国Zoecon公司、Provesta公司、Trece公司和日本相继商品化，广泛应用。

从许多合成物的田间筛选试验中发现了几种对果实蝇具强烈引诱作用的引诱剂，并在实际应用中发挥出重要作用。如地中海实蝇的引诱剂为三甲基诱；对瓜实蝇（*D. cucurbitae*）具强烈活性的瓜蝇诱；橘小实蝇（*D. dorsalis*）的引诱剂为甲基丁香酚。它们均不是信息素，甚至连引诱机制都不清楚，但却十分有效，已连续使用达20年以上。

此外，乙醇可增加S（+）-苏尔卡醇对粉蠹 *G. retusus* 的引诱活性，乙醇和α-蒎烯分别能增强粉蠹 *G. sulcatus* 雄虫对苏尔卡醇的反应。

## 2 昆虫性信息素防治害虫的原理和方法

昆虫性信息素是成虫在性成熟后释放出来引诱异性的一类化学活性物质。因此在田间设置一定数量的性信息素诱捕器，可以诱杀大部分异性个体，以减少田间种群数量，使虫

口保持在作物能忍受的程度内，或者在田间大量释放性信息素的气味，扰乱雌雄虫的交配前通讯联系，致使雌雄虫无法进行交配繁殖后代，从而达到防治目的。目前田间使用的防治技术有以下几种方法。

## 2.1 诱捕法

### 2.1.1 大量诱捕法

大量诱捕法又称灭雄技术。这是利用雌虫释放的性信息素对雄虫的引诱原理来进行的。用合成的性信息素或雌虫粗提物装入诱捕器，每只诱捕器就象一头活雌虫，在田间召唤雄蛾前来交尾。在防治田块中或田间外围设置一定数量的诱捕器，大量诱杀雄虫或雌雄两性昆虫，造成田间雌雄两性成虫比例失调，从而减少雌雄虫间的交配机率，使下一代虫口密度大幅度下降，达到防治害虫的目的。如果诱捕器的数量和有效诱捕范围能够与田间自然雌虫相竞争时，就能控制昆虫的种群数量。

### 2.1.2 作物诱集法

播种前在田间先种上几行作物，使它比其他作物生长早，然后将信息素喷洒在这几行作物上，诱使大部分害虫集中在小范围内，用杀虫剂处理。也可将信息素和杀虫剂混合后使用，直接喷洒在局部范围内的作物上，使诱来的害虫接触杀虫剂致死。这两种方法防治害虫都可以减少化学杀虫剂的使用量和使用范围，使杀虫剂对天敌的影响减至最小。如棉铃象甲就是用这种方法来防治的。美国农业部曾经将棉红铃虫的性信息素、氯氰菊酯、粗糖、棉籽油和棉籽粉混合，并加入一种表面活性剂，掺水直接喷洒在棉株上部棉叶上，有效地控制棉红铃虫的为害。因为性信息素对雄蛾有强烈的引诱作用，诱来的雄蛾在企图与棉叶交配时接触杀虫剂很快致死。这种方法不仅能杀死雌雄棉红铃虫成虫，对棉叶上部活动的其他害虫也有一定的杀死作用，这显然比单用信息素处理的防治效果要好得多。

### 2.1.3 信息素与其他防治方法的配合作用

性信息素与黑光灯、电网、化学不育剂和病毒杀虫剂等结合使用，可显著提高诱杀和防治效果。如在装有性信息素诱捕器内壁，涂上一层微量的化学不育剂，使成虫接触后成为不育雄虫，再飞回田间与正常雄虫竞争和雌虫交配，结果雌虫产下的卵为不育卵。采用这种擒后又放的方法，要比直接诱杀雄虫更有效。但是这种防治方法要进入实际应用，必须找到一种有效和安全的化学不育剂。性信息素与病毒或细菌杀虫剂的结合使用，其原理与化学不育剂类同，使诱来的雄虫接触病原体并携带病原体飞回群体，经扩散蔓延造成流行病。这种方法已在仓库害虫皮蠹上进行了尝试。

诱捕法是一种简单而方便的害虫防治技术，适用于防治一生只交配1次的昆虫、雄性早熟或对雌雄两性昆虫同时发生引诱作用的害虫。特别在虫口密度低的田块中使用诱捕法效果比较明显。如田间虫口密度较高，须用化学杀虫剂或其他的防治措施压低虫口，再采用大量诱杀技术，杀死漏网害虫。多数田间防治试验表明，虫口密度过高，不采用其他防治措施，单靠诱捕法防治很难收到理想的效果。这是因为许多农业害虫雌雄比例大多接近

1:1，自然界的每头雌虫似同一只"诱捕器"，在虫口密度过高的情况下，人工放置的诱捕器竞争不过田间雌虫释放的天然性信息素，况且大多数昆虫都有多次交配的习性。如一头棉红铃虫雌蛾在野外平均交配2～3次，最高可达9次；一头雄蛾也可交配9次；而麦蛾雄蛾最高可交配12次之多。因此，尽管诱杀了相当数量的雄虫，而残存下来的雄虫足以满足繁衍后代之需要。根据性信息素诱捕器同田间害虫竞争的能力、蛾子羽化日程、存活力及雄性先熟等因素，罗依洛夫通过理论计算认为采用诱捕法防治害虫，诱捕器同雌蛾的数量比至少要达到5:1，才能抑制95%害虫的交配。也有人认为只有消灭90%甚至95%以上的雄虫，诱捕法才有实际意义。但是这些论点都是理论性的估计，实际上大量诱杀的防治效果与害虫种类、田间虫口密度、天敌及环境条件等密切相关。其实，性信息素诱捕法在实际应用时，也并不要求消灭全部害虫，只要求将虫口压低到一定数量，然后利用天敌等其他因素的作用，也能有效地控制害虫繁殖。

性信息素诱捕法防治害虫，国内外都已作了不少试验，迄今大量诱捕法防治害虫成功的实例还不多，要达到一定的防治效果，必须使用很高密度的诱捕器，以臻难以克服由于诱捕器的费用和保持所带来的困难。甚至昆虫还可能将信息素组分或配比改变，从而对大量诱捕法产生抗性。尽管大量诱捕法不一定对每种害虫都有效，使用上还存在着一些问题。但是大量诱捕技术在较大面积内防治棉红铃虫、埃及棉夜蛾、斜纹夜蛾、葡萄小食心虫、梨小食心虫、杨树透翅蛾和云杉茎皮小蠹等的试验表明，在虫口密度不太高的情况下，效果都较满意。例如以色列在3 000$hm^2$棉田中采用大量诱捕技术防治埃及棉夜蛾，诱捕器密度为每公顷1～2只，结果使杀虫剂用量减少了30%～40%。日本防治蔬菜和甘薯上的斜纹夜蛾得到了同样的效果。我国在数万公顷林地和果园内用大量诱捕法防治杨树透翅蛾和梨小食心虫也获得了显著的经济效益。特别是大量诱捕技术与其他防治措施配合使用，显示了一定的潜力。因此，各国对诱捕法仍十分重视，这一技术如何在害虫综合治理中巧用，值得进一步研究。

### 2.2 干扰交配法

干扰交配法又称迷向法。1960年美国的贝鲁萨首先提出用人工合成的性信息素，弥散于大气中以扰乱雌雄蛾交配前的信息联系，从而达到防治害虫的设想。因为在自然环境条件下，雌蛾在准备交尾前先释放性信息素，释放的性信息素迅速挥发，当信息素分子顺风飘走时，便在空气中形成了一条信息素带。雄蛾一发现此带便逆风搜索雌蛾，找到雌蛾后进行交配，尔后雌蛾就会产下受精卵。如果将有性信息素的载体大量撒布于田间，每一载体相当于一头或多头假雌蛾，在整个作物区形成了无数假雌蛾，每头假雌蛾都释放性信息素并形成一条性信息素带，雄蛾就失去了对真雌蛾的定向，这样就扰乱了雌雄蛾交配前正常的信息联系，使雄蛾无法找到真正的雌蛾进行交尾，从而减少了田间幼虫的为害，达到控制害虫种群数量的目的。加斯顿等通过粉纹夜蛾的试验，最早证明性信息素顺-7-十二碳烯醇醋酸酯，可以扰乱雄蛾的定向。试验在27m×27m的田块上进行，每隔3m放一只直径为22mm的不锈钢盘，装约17mg信息素，第4天再加约9mg样品，不锈钢盘上盖一铁丝网以防蛾子进入。在田块中心处设一诱捕器，内放10头未交配的雌蛾，对照区设在600m以外。试验期间，对照区的诱捕器共诱到102头雄蛾，而处理区未诱到一头雄

蛾。这个试验结果说明，空气中弥散的合成性信息素可以阻止雄蛾对雌蛾的定向，破坏雌雄蛾间交配前的通讯联系，从而控制害虫的繁殖。

目前对于干扰交配技术防治害虫的机理研究较少。从一些研究结果推测，可能有三种机理。第1种机理是感觉适应，因为雄蛾持续地暴露于人为的高浓度信息素下，触角感受器产生适应现象，停止传输信息到中枢，因而对求偶雌蛾所释放的信息素无反应；第2种是中枢神经的惯化，当雄蛾暴露于信息素气味下时，出现一系列的行为反应后，但没有找到雌蛾完成交配，以后再接受同样的刺激信号，雄蛾也会失去行为反应，这种惯化作用可持续数分钟甚至数小时；第3种为迷向作用，即人为地将信息素释放源同求偶雌蛾释放的信息素同时充满田间时，如果引诱力大大超过求偶雌蛾，雄蛾则趋向合成源而失去了对求偶雌蛾的定向能力。

昆虫性信息素直接防治害虫的新方法颇受人们的重视，扰乱交配法有3种可采用的技术。

(1) 昆虫复合性信息素　这种方法是用人工合成的目标昆虫性信息素弥散于大田，扰乱雌雄虫交配前的性信息联系。例如加斯顿等在 $23hm^2$ 棉田里将装有棉红铃虫性信息素的空心纤维撒布在大田中，每隔1m放一根纤维，3周加样1次，前后共加样5次，结果花害、铃害明显减少，达到了控制棉红铃虫为害的目的。

(2) 昆虫单一组分性信息素　大多数昆虫的性信息素是由一个以上的化合物混合而成，每种昆虫都对自身的性信息素的化学结构和各成分间的比例要求十分严格，如果人为地释放一定量的单一组分化合物，破坏雄蛾感受信息素时所要求的严格比例，也同样可以扰乱雌雄蛾之间的交配通讯联系，达到减少交配的目的。单组分信息素往往本身对雄蛾没有引诱作用，因此就不会将外界的雄蛾诱人试验区。有人在 $15.2m^2$ 试验区内，用斜纹夜蛾性信息素含量较少的组分顺-9-反-12-十四碳二烯醇醋酸酯4mg处理，结果结扎在竹竿上的36头雌蛾的交配率减少了90.2%。使用同样剂量的主要成分顺-9-反-11-十四碳二烯醇醋酸酯处理，交配率下降了86.8%。而用复合性信息素时雌蛾交配率仅下降61.2%。

(3) 昆虫性信息素类似物　昆虫触角上的感受器对雌蛾释放的天然性信息素的结构具有较高的特殊选择性，但是最近几年田间筛选研究发现，有些化合物其化学结构和天然性信息素非常相似，它也具有刺激昆虫感受器的作用，引起类似的行为反应。尽管大多数类似物的生物活性比天然性信息素低，若将其弥散于田间，同样起到扰乱和破坏雌雄间的交配通讯联系的作用。例如"海克"引诱剂是棉红铃虫天然性信息素的类似物，它对雄蛾的引诱活性又是天然性信息素的1/100，如将它弥散于棉田中，也能起到扰乱雌雄蛾交配前通讯联系的作用，不过只有当"海克"引诱剂的用量为"高斯"的100倍时，才能产生与用天然性信息素相似的效果。

总之，昆虫性信息素的化学成分、产生过程、释放步骤、调控机理和行为反应，都是十分复杂的生理、生化和行为过程。只有在深人了解这些过程的基础上，才能更为有效地投人田间应用，产生显著的经济和生态效益。

# 主要参考文献


[1] 王良臣．玉米螟性外激素腺体组织学研究．昆虫知识，1978，15（6）：187～189

[2] 王良臣．二化螟性外激素与其腺体的发育．昆虫知识，1981，18（1）：34

[3] 王荫长，陈长琨，韩召军．昆虫生理生化学．北京：中国农业出版社，1994

[4] 王荫长，朱荣生，陈长琨，尤子平．两种地老虎幼虫表皮结构的研究，昆虫学报，1990，33（3）：309～313

[5] 王荫长，尤子平．小地老虎飞行肌的超微结构与飞行能力的研究，昆虫学报，1986，29（3）：252～258

[6] 刘惠霞，李新岗，吴文君．昆虫生物化学．西安：陕西科学技术出版社，1998

[7] 关雪辰．昆虫神经肽 allatostatin 与 allatotropin 的研究新进展．昆虫学报，1996，39（2）：214～218

[8] 杜家纬．三化螟性信息素的研究Ⅰ．求偶行为．昆虫学报，1988，31（1）：110～112

[9] 李乾君，龚和．昆虫卵黄发生研究进展．昆虫学报，1995，38（2）：237～247

[10] 李冰祥，蔡惠罗，陈永林．昆虫热休克反应和热休克蛋白．昆虫学报，1997，40（4）：417～427

[11] 张善干，张玉华，陈德明．红尾白螟和三点螟性外激素分泌腺的形态构造．昆虫学报，1989，32（1）：80～82

[12] 陈长琨，王荫长，朱荣生．夜蛾科昆虫"细胞变态"模式的研究．南京农业大学学报，1996，19（1）：34～41

[13] 陈长琨，韩召军，王荫长．昆虫生理生化实验技术．北京：农业出版社，1993

[14] 周祖琳．麦蛾交配过程中精包的形成．昆虫学报，1989，32（4）：501～502

[15] 徐建华，尚稚珍．昆虫神经肽研究进展．昆虫知识，1995，32（5）：307～309

[16] 陈长琨，王荫长，尤子平．棉铃虫血淋巴和脂肪体蛋白质含量及动态变化的研究，南京农业大学学报，1988，11（3）：136～138

[17] 李毅平，龚和．昆虫幼虫储存蛋白，生物学通报，1998，33（1）：4～5

[18] 陈长琨，王荫长，尤子平．小地老虎［*Agrotis ypsilon*（Rottemberg）］在个体发育过程中血淋巴蛋白含量和类型变动的初步研究，南京农学院学报，1984，1：1～8

[19] 陈长琨，李国清，王荫长，卢中建．小地老虎雄蛾中胚层生殖道和附腺的细胞和功能，昆虫学报，1998，41（3）：263～268

[20] 陈长琨，李国清，王荫长，胡冰．小地老虎雄蛾中胚层生殖道腺缢缩瓣膜结构和功能，昆虫学报，1988，41（3）：269～274

[21] 陈长琨，王荫长，韩振华，尤子平．小地老虎蜕皮腺的形态和结构，昆虫学报，1992，35（2）：142～147

[22] 陈长琨，朱荣生，王荫长，尤子平．小地老虎马氏管细微结构的特点，昆虫学报，34（4）：417～420

[23] 卢中建，王荫长，尤子平．小地老虎真核和无核精子的超微结构，南京农业大学学报，1993，16（3）：38～43

[24] 大西英爾，園部治之，高橋進．昆虫的化学分子生物学．名古屋大学出版社，1995

[25] 長谷金川．昆虫变态的生理生化（张义成、陆明贤译）．北京：农业出版社，1988

[26] Andersen P., Hilker, M., Hansson, B.S., Bombosch, S., Klein, B.and Schildknecht, H.Oviposition deterring components in larval frass of *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae): a behavioral and electrophysiological evaluation. *J. Insect Physiol*. 1993, 39: 129～137

[27] Andersen, S.O.Hφjrup, P.and Roepstorff, Insect cuticular proteins, *Insect Biochem*, *Molec. Biol*. 1995, 25 (2): 153～176

[28] Andersen, S.O. Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*, *Insect. Biochem. Molec. Biol*. 1998, 28 (2): 421～434

[29] Andersen, S.O. Rafn, K.and Roepstorff, P. Sequence studies of proteins from larval and pupal cuticle of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*, *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1997, 27 (2): 121～123

[30] Ancsin, J.B., Wyatt, G.R. Purification and characterization of two storage proteins from *Locusta migratory* showing distinct developmental and hormonal regulation, *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1996, 26 (5): 501～510

[31] Baldaia, L, Maisonhaute, C., Porchero, P.et al., Effect of heat shock on protein synthesis in *Locusta migratoria* epidermis. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 1987, 4: 225～231

[32] Becker, J, and Craig, E.A. Heat-shock proteins as molecular chaperones, *Eur*, *J. Biochem*. 1994, 219: 11～13

[33] Behan, M.and Schoonhoven, L.M., Chemoreception of an oviposition deterrent associated with eggs in *Pieris brassicae*. *Entomol. Exp. Appl*. 1978, 24: 163～179

[34] Candy D.J, Intermediary metabolism in Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, Eds Kerkut, G.A.and Gilbert L.I. 1985 Vol 10: 1～36

[35] Chapman, R.F., The insect: structure and function (3rd ed) Cambridge: M.A., Harvard Univ. Press. 1982

[36] Chen P.S., The functional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions *Ann. Rev. Entomol*. 1984, 29: 233～255

[37] Chen P.S., The accessory gland proteins in male *Drosophila*: structural, reproductive and evolutionary aspects, *Experientia*, 1996, 52: 503～510

[38] Chou, T.S., Liang, D.and Carter C.S., Effects of mating and grouping on oocyte development and pheromone release activities in *Supella longipalpa* (Dictyoptera: Blatellidae). *Env. Entomol*. 1990, 19: 1716～1721

[39] Cook, H., Orchard, I., The short-term effects of 5, 7-dithydroxyptamine on peripheral serotonin stores in *Rhodnius prolixus* and their long-term recovery. *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1993, 23 (8): 895～904

[40] Corpuz, L.M., Muthukrishnan, C.S., Krame, K.J. Seguences of two cDNAs and expression of the genes encoding methionine-rich storage protein of *Manduca sexta*, *Iusect Biochem*. 1991, 21 (3): 265～276

[41] Christensen, T.A., Lehman, H.K.Teal, P.E.A, Itagak, H., Tumlinson, J.H.and Hilderbrand, J.G.Diel Changes in the presence and physiological actions of octopamine in the female sex-pheromone glands of heliothine moths *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1992, 22 (8)

[42] Crews, D., Effects of group stability, male-male aggression, and male courtship behavior on environmentally induced ovarian recrudescence in the lizard, *Anolis carolinensis*. *J. Zool*., *Lond*. 1974, 172:

419～441

[43] Crews, D., Psychobiology of reptilian reproduction. *Science* 1975, 189: 1059～1065

[44] Crews, D., Termoto, L. and Carson, H.L., Behavioral facilitation of reproduction in sexual and parthenogenetic *Drosophila*. *Science* 1985, 227: 77～78

[45] Cusson M., Yu, C.G.Carruthers, K.Wyatt, G.R., Tobe S.S., McNeil, J.N., Regulation of vitellogenin production in armyworm moths, *Pseudaletia unipuncta* *J. Insect Physiol* 1994, 40 (2): 129～136

[46] Frank M.H.Mini-review. Neuroendocrine control of insect ecdysis by eclosion hormone. *J. Insect Physiol.*, 1996, 42 (10): 917～924

[47] Croddock, E. and Boake, C.R.B., Onset of vitellogenesis in female *Drosophila silvestris* is accelerated in the presence of sexually mature males. *J. Insect Physiol*. 1992, 38: 643～650

[48] Dempster, J.P. Evidence of an oviposition-deterring pheromone in the orange-tip butterfly, *Anthocharis cardamines* (L.). *Entomol*. 1992, 17: 83～85

[49] Dotson, E.M., Cornel, A.J., Willis, J.H. and Collins F.H., A family of pupal-specific cuticular protein genes in the mosquito, *Anopheles gambiae*, *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1998, 28: 459～472

[50] Don-wheeler, G., Engelmann, F., The biosynthesis and processing of vitellogenin in the fat bodies of females and males of the cockroach *Leucophaea maderae*, *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1997, 27 (11): 901～918

[51] Gäde. G., Hoffmann K.H. and Spring, J.H., Hormonal regulation in insect: facts, gaps, and future directions. *Physiol, Rev.*, American Physiological Society. 1997, 77 (4): 963～1032

[52] Gadot, M., Burns, E. and Schal, C. Juvenile hormone biosynthesis and oocyte development in adult female *Blatella germanica*: Effects of grouping and mating., *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 1989, 11: 189～200

[53] Hans, G.B., Hulmark, D., Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.*. 1987, 41: 103～126

[54] Happ, G.M., Schroeder M.E. and Wang, J.C.H., Effects of male and female scent on reproductive maturation in young female *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol*. 1970, 16: 1563～1548

[55] Haunerland, N.H, Insect storage proteins: Gene families and receptors, *Insect Biochem, Molec Biol.*, 1996, 26 (8～9): 755～765

[56] Highnam, K.C. and Lusis, O. The influence of mature males on the neurosecretory control of ovarian development in the desert locust. *Quart. J. Micr. Sci*. 1962, 103: 73～83

[57] Hilker, M., Larvenkot als Eiablage-Detrens bei *Spodoptera littoralis*. *Naturewiss*. 1985, 72: 485～486

[58] Holman, G.M., Insect neuropeptides. *Ann. Rev. Entomol.*, 1990, 35: 201～217

[59] Hopkins, I.L. and Kramer, K.J., Insect cuticle sclerotzation. *Ann. Rev. Entomol*. 1992, 37: 273～301

[60] Horodyski, F.M., Neuroendocine control of insect ecdysis by eclosion hormone, *J. Insect Physiol*. 1996, 42 (10): 917～924

[61] Hua, Y.J., Koolman, J. An ecdysiostatin from flies, *Regulatory Peptides* 1995, 57: 263～271

[62] Hua, Y.J., Jiang, R.J. and Koolman, J., Multiple control of ecdysone biosynthesis in blowfly larvae: Interaction of ecdysiotropins and ecdysiostatins, *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 1997, 35: 125～134

[63] Hwang, Y.S., Schultz, G.W. and Mulla, M.S. Structure-activity relationship of unsaturated fatty acids

as mosquito ovipositional repellents. *J. Chem. Ecol*. 1984, 10: 145～151

[64] Izumi, S., Yano, K. Yamamoto, Y. and Takahashi, S.Y. Yolk proteins from insect eggs: Structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis, *J. Insect Physiol*. 1994, 40 (9): 735～746

[65] Jane, A.R., Marc, M. and Philippe. B., Novel antibacterial peptides isolated from a European bumble bee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea)., *Insect Biochem. Molec. Biol*, .1997, 27 (5): 413～422

[66] Jensen, U.G., Rothmann, A., Skou, L., Andersen, S.O. Roepstorff, P. and Hϕjrup. P. Cuticular proteins from the giant cockroach, *Blaberus craniifer*, *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1997, 27 (2): 109～120

[67] Kanai, A., Natori, S. Analysis of a gene cluster for sarcotoxin Ⅱ, a group of antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina*., *Molecular and cellular Biology*. 1990.10 (12): 6114～6122

[68] Kanost. M, Kawooya, J., Law, J., Ryan, R., Van Heusden, M. and Ziegler. Insect hemolymph proteins, *Adv. Insect Physiol*, 1990, 22: 298～396

[69] Kaufman, R., Sloley, D., Catabolism of dopamine and 5-hydroxytryptamine by monoamine oxidase in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*, *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1996, 26 (1): 101～109

[70] Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I, (Eds), Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, Pergamon Press, Oxfrod, 1985

[71] Klein, B., Schildkecht, H., Hilker, M. and Bombosch, S., Eiablagehemmende wirkstoffe aus dem lavenkot von *Spodoptera littoralis*. *Z. Natuf*. 1990, 45c, 895～901

[72] Klijnstra, J.W. and Roessingh, P., Perception of the oviposition deterring pheromone by tarsal and abdominal contact chemoreceptors in *Pieris brassicae*., *Entomol. Exp. Appl*. 1986, 40: 71～79

[73] Koolman J., Control of ecdysone biosynthesis in insects, *Neth J. Zool*. 1995, 45: 83～88

[74] Korochkina, S.E. and Gordadze, A.V., York, J.L. and Benes, H., Mosquito hexamerins: Characterization during larval development, *Insect Molecular Biology*, 1997, 6 (1): 712～721

[75] Kramce, K., Muthukrishnan, S., Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides, *Insect Biochem. Molec Biol*. 1997, 27 (11): 887～900

[76] Leppla, N.C. et al., Laboratory studies of the courtship of the velvetbean caterpillar moth, *Anticarsia temmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annal of the Entomological Society of America*, 1987, 70 (6): 273～283

[77] Lensky, Y., Cassier, P., Finkel, A., Delôrme-Joulie, C. and Levinsohn, M. The fine structure of the tarsal glands of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera). Cell Tissue Res. 1985, 24: 153～158

[78] Lensky, Y, Finkel, A., Cassier, P., Teeshbee. A. and Schlesinger, R., The tarsal glands of the honeybee (*Apis mellifera* L.) queens, workers and drones-chemical characterization of foot-print secretions. *Honeybee Sci*. 1987, 8: 97～102

[79] Lensky, Y. and Slabezki, Y., The inhibiting effect of the queen bee (*Apis mellifera* L.) foot-print pheromone on the construction of swarming queen cups. *J. Insect Physiol*. 1981, 27: 313～323

[80] Levenbook, L, The structure and function of calliphorin. The larval serum proteins of insects (Scheller, K. ed) 1～7, Thieme, Stuttgart. 1983

[81] Levenbook, L. Insect storge proteins, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Vol.10 .307～346, Pergamon Press, Oxford. 1985

[82] Lindquist, S.and Craig E.A., The heat-shock proteins *Annu, Rev. Genetics* 1988, 22.631～677

[83] Ma, P.W.K., Roelofs, W.L.Jurenka, R.A., Characterization of PBAN-encoding gene neuropeptides in the central nervoussystem of the corn earworm moth, *Helicoverpa zea*, *J. Insect Physiol*. 42 (3): 257～266

[84] Maki.N., Yamaghita, O., Purification and characterization of a protease degrading 30kDa yolk proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1977, 27 (8/9): 721～728

[85] Marcu, O.and Locke, M.A cuticular protein from tne moulting stages of an insect, *Insect Biochem, Molec. Biol*., 1998, 28: 659～669

[86] Marin, R., Blaker, T., Tangnay, W., HSP 78: A prominent heat shock protein of the Lepidopteran *Choristonenra funiferana* that is immunologically unrelated to members of the major HSP families. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 1994, 25: 39～53

[87] Mariana, F.W., Mini-review. Function and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 1997, 27 (3): 179～192

[88] Mitchell, E.R.and Heath, R.R. Influence of *Amaranthus hybridus* L. allelochemicals on oviposition, behavior of *Spodoptera exigua* and *S. eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Chem. Ecol* 1985, 11: 609～618

[89] Menn, J.J., Kelly T.J.and Master, E.P. Insect Neurioeptide, chemistry biology and action, American Chemical Society Washington D.C., 1991

[90] Mudd, A Further novel 2-acylcyclohexane-1, 3-diones from Lepdopteran larvae. J. Chem Soc. Perkin. Trans. Ⅰ 1983, 2161～2164

[91] Nagasama H., Mini review. Recent advances in insect neuropeptides. *Comp. Biochem. Physiol*., 1993, 106C (2): 295～300

[92] Nakato, H., Takekoshi, M., Togawa, T. Izumi, S.and Tomino, S., Purification and cDNA cloning of evolutionally conserved larval cuticle proteins of the silkworm, *Bombyx Mori*, *Insect. Biochem. Molec. Biol*. 1997, 27 (8/9): 701～709

[93] Navasero, R.C.and Ramaswamy S.B., Influence of plant age, water stress, larval damage, and presence of nonspecific eggs on oviposition by *Heliothis virescens* (F.) on cotton., *J. Appl. Entomol*. 1993, 115: 97～106

[94] Oldham, R.S. Ovulation induced by vocalization on members of the *Rana pepiens* complex, *J. Herpetol* 1975, 9: 248～249

[95] Peter, C., Jill, R., Madalyn, C, Katty, C., Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. Prospects of manipulating the antibacterial spectrum and combating acquired resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (42): 26107～26115

[96] Philippe, B., Gilbert, H.Jean, L., Alain, V.D., Jules A.H., Clarles.H.. Insect immunity. The inducible antibacterial peptide diptericin carried two O-glycans necessary for biological activity. *Biochemistry*, 1995, 34: 7394～7400

[97] Poirier, L.M.and Borden, J.H., Recognition and avoidance of previously laid eggs masses by the oblique-banded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Insect Behav*. 1991, 4: 501～508

[98] Prokopy, R.J., Epideictic pheromones that influence spacing patterns in phytophagous insects. In *Semiochemicals: their Role in Pest Control* (Eds Nordlund, D.A., Jones, R.L. and Lewis W.J.) .pp. 342～406. Wiley, New York. 1981

[99] Raikhel, A.S, Dhadialla T.S., Accumulation of yolk proteins in insect oocytes *Annu*,

*Rev . Entomol* .1992，37：217～251

[100] Raabe, M., Recent developments in insect neurohormones, Plenum Press, New York.1989

[101] Riddiford, L.M., Cellular and molecular action of juvenile hormone .General considerations and premetamorphic actions, *Advances insect physiology* 1994, Vol.24：214～274

[102] Rajaratnam, V.S., Isolation, characterization and complete nucleotide sequence of a *Galleria mellonella* cDNA coding for the follicle cell-specific yolk protein YP4, *Insect molec . Bilo* .1996, 26 (6): 545～555

[103] Raikhel A.S.Dhadialla T.S.Accumulation of yolk proteins in insect oocytes, *Anu . Rev . Entomol* .1992, 37：217～251

[104] Rella L.A., Peter E.A.T.And James H.T.Age and crowing affects the amount of sex pheromone and the oviposition rates of virgin and mated females of *Helicouerpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) . *Ann Entomol . Soc . Am* .1994, 87：350～354

[105] Richard, D.S., Watkins, N.L.Serafin, R.B., Gilbert, L.I., Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes, *Journal of Insect Physiology*, 1998, 44：637～644

[106] Robert I L, Thomas G, Michael E.S., Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal *cell* . Cell, 1991, 64：229～230

[107] Renwich, J.A.A., Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annu . Rev . Entomol* .1994, 39：377～400

[108] Rong-kou et al.Calling behavior of the cotton bollworm, *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) . *Annal of the entomological society of America*, 1987, 80 (4): 490～493

[109] Rotnschild M.and Schoonhoven, L.M., Assessment of egg loads by *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) . *Nature* 1977, 266：352～355

[110] Sappington T.W, Raikhel, A.S., Molecular characteristics of insect viellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem . Mole . Biol* 1998, 28：277～300

[111] Schelling, D., Jones, G.Analysis of induction of hsc 70, hsp 82 and Juvenile hormone esterase genes by heat shock in *Trichoplusia ni*, *J . Insect Physiol* .1996, 42 (4): 295～301

[112] Schoonhoven, L.M., Sparnaay, T., van Wissen, W.and Meerman, J., Seven-week persistence of an oviposition-deterring pheromone. *J . Chem . Ecol* ., 1981, 7：583～588

[113] Schoonhoven, L.M., Beerling, E.A.M, Braaksma, R., and van Vugt, Y., Does the imported cabbageworm, *Pieris rapae*, use an oviposition deterring pheromone? *J . Chem . Ecol* .1990, 16: 1649～1655

[114] Schoonhoven, L.M., Beerling, E.A.M., Kiljnstra, J.W., and van Vugt, Y.Two related butterfly species avoid oviposition near each other's eggs. *Experietia* 1990, 46：526～528

[115] Scott, M.P.and Traniello, J.F.A.Behavioral cues trigger ovarian development in the burying beetle, *Nicrophorus tomentosus* . *J . Insect Physiol* .1987, 33：693～696

[116] Serguei, C., Stephane, C., Jean-Paul, B., Charles, H., The inducible antibacterial peptides of the hemipteran insect *Palonema prasina*: Identification of a unique family of prolinerich peptides and of a novel insect defensin. *J . Insect Physiol* ., 42 (1): 81～89

[117] Shapiro, A.M., The period red-egg syndrome. *Am . Nat* .1981, 117：276～294

[118] Slaytor, M., Veivers, P.C.and Lo, N., Aerobic and Anaerobic metabolism in the higher termite *Nasutitermes Walkeri* (Hill) . *Insect Biochem . Molec Biol* ., 1997, 27 (4): 291～303

[119] Sohi, S.S.Palli, S.R., Cook, B.J., Retnakaran, A.Forest insect cell lines responsive to 20-hydroxyecdysone and two nonsteroidal ecdyson agonists, RH-5849 and RH-5992, *J . Insect Physiol* .1995, 41

(6): 457～464

[120] Sugumaran M., Molecular mechanisms for cuticular sclerolization, *Adv. Insect physiol*. 1988, 21: 179～231

[121] Smid, H.M., Schooneveld.H., Desemo.M.L.L.G., Put.B.Valk, J.M., Expression of a male accessory gland peptide of *Leptinotarsa decemlineata* in insect cells infected with a recombinant baculovirus, *Journal of Insect Physiology* 1998, 44: 255～262

[122] Swier, S.R.et al.Age-related calling behavior of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Annul of the entomological society of America*, 1977, 70 (6): 919～924

[123] Takahashi, S.Y., Yamamoto, Y.Zhao X.F. and Watabe, S.Bombyx acid cysteine proteinase, *Invertebrate Reproduction and Development*, 1996, 30 (1～3): 265～281

[124] Telfer, W.H and Kunkel, J., The funcfion and evolution of insect storage hexamers. *Annu. Rev Entomol* 1991 36: 205～228

[125] Teal.P.E.A., Nachman R.J.Fang, Meredith, J.M. and Tumlinson.J.H.Pheromone biosynthesis ac tivating neuropeptides, functions and chemistry, *Peptides*. 1996, 17: 337～344

[126] Thiry, E., Hoffman, K.H.Dynamics of ecdysone and 20-hydroxyecdysone metabolism after injection and ingestion in *Gryllus bimanculatus* (DE GEER) *Zool. Jb. Physiol* 1992, 96: 17～38

[127] Thiéry, D.and Le Quéré, J.L., Identification of an oviposition-deterring pheromone in the eggs of the European corn borer. *Naturwiss*, 1991, 78: 132～133

[128] Thiéry, D., Gabel, B., Farkas, P.and Pronier, V., Identification of an oviposition-regulating pheromone in the European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Exprrintia*, 1992, 48: 697～699

[129] Thiéry, D., Gabel, B.and Pouvreau, A., Semiochemical isolated from the eggs of *Ostrinia nubilatis* as oviposition deterrent in the three other moth species of different families. In *Proceedings of the Eighth International Symposium on Insect-Plant Relationships* (Eds Menken, S.B.J., Visser, J.H.and Harrewijn, P.) pp.149～150.Dordrecht: Kluver Academic.1992

[130] Thompson, J.N., Selection pressures on phytophagous insects on small host plants. *Oikos* 1983, 40: 438～444

[131] Vandenbergy, J.G. (Ed.), Pheromones and reproduction in mammals.Academic Press New York.1983

[132] Wang, Z.and Haunerland, N.H., Storage protein uptake in *Helicoverpa zea* fat body.A single receptor mediates the uptake of arylpborin and VHDL. *Arch Insect Biochem. Physiol*. 1994, 26: 15～26

[133] Wilcoxon, F., Individual comparisons by ranking methods. *Biomet. Bull*. 1945, 1: 80～83

[134] Williams, A.L., Mitchell, E.R., Heath, R.R.and Barfield, C.S., Oviposition deterrents for fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from larval frass, corn leaves, and artificial diet. *Envir. Ent*. 1986, 15: 327～330

[135] Wolfner, M.F.Tokens of Love: Functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products, *Insect Biochem. Molec. Biol*. 1996, 27 (3): 179～192

[136] Wyatt G.R., Gene regulation in insect reproduction. *Invert. Reprod. Devel*. 1991, 20: 1～35

[137] Xu, R., Huang, Hopkins and Kramer, Catecholamine and histidylprotein cross-linked structures in sclerotized insect cuticle, *Insect Biochem, Molec. Biol*. 1997, 27 (2): 101～108

[138] Yocum, G.D., Denlinger, D.L., Prolonged thermotolerance in the fest fly *Sarcophaga crassipalis* does not require continuous expression or persistence of the 72 KDa heat shock protein. *J. Insect Physiol*.

1992, 38: 603~609

[139] Yocum, G.D., Joplin, K.H., Denlinger, D.L., Upregulation of a 23 KDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 1998, 28: 677~682

[140] Zhao, X.F. Wang J.X. and Wang Y.C. Purification and characterization of a cysteine proteinase From eggs of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigea*, *Insect Biochem. Mole Biol.* 1998, 28: 259~264

[141] Zhao, X.F., Wang J.X. Noriko, Y., Yamamoto. Y., Watabe, S. Takahashi, S.Y. Occurrence of a cathepsin B-like acid cysteine proteinase in the eggs of silkworm moth *Antheraca pernyi Comp Biochem. Physiol.* 1996, 113B. 95~103

[142] Zhou B.H., Hiruma K., Jindra, M., Shinoda, T. Segraves, W.A., Malone, F. and Riddiford, L.M., Regulation of the transcription factor E75 by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis, *Developmental Biology* 1998, 193: 127~138

[143] Zhou, B.H., Hiruma, K., Shinoda, T, and Riddiford, L.M. Juvenile hormone prevents ecdysteroidinduced expression of broad complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Deve lopmental Biology*, 1998, 203: 233~244

［Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ］
书名＝昆虫生物化学
作者＝
页数＝４８８
ＳＳ号＝０
出版日期＝
Ｖｓｓ号＝８７８５０１９８